

1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Atherosklerose und atherosklerotische Komplikationen verursachen 50% der Sterbefälle in industrialisierten Ländern. Folge der Atherosklerose sind koronare Herzkrankheit (KHK) und Herzinfarkte, periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK), AVK der Hirnarterien und Schlaganfälle.

Neben genetischen Komponenten und Ernährungsfehlern gelten alle Aspekte des metabolischen Syndroms als Risikofaktoren für die Atheroskleroseentstehung. Das metabolische Syndrom ist definiert als die Kombination aus Übergewicht, Insulinresistenz/Diabetes, Hypertension, erniedrigtem HDL, Hypertriglyzeridämie und Hyperkoagulopathie.

Die steigende Inzidenz von Übergewicht und metabolischem Syndrom stellen grosse gesundheitliche Probleme dar. Die pathogenetischen Hintergründe über die Übergewicht, Insulinresistenz und Diabetes die Atheroskleroseentstehung fördern beinhalten gestörte Vasodilatation, endotheliale Dysfunktion und erhöhte Proliferation glatter Muskelzellen. Insulinresistenz selbst führt zu einer gesteigerten Produktion oder gestörten Aufnahme von freien Fettsäuren durch Adipozyten.

Charakteristisches Merkmal in allen Stadien der Atheroskleroseentstehung ist die Migration und Proliferation verschiedener Zelltypen. Die Adhäsion mononukleärer Zellen an das Gefäßendothel und deren Migration durch die Intima stellen ein Schlüsselereignis dar. Die früheste atherosklerotische Manifestation sind sog. Fatty streaks / Fettstreifen, sichtbare Ablagerungen, reich an Lipid gefüllten Makrophagen (Schaumzellen) (1).

Zellmigrations- und Proliferationsprozesse unterliegen einer feinen Regulation. Neben verschiedenen Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Matrixmetalloproteinasen kommt hierbei auch dem fibrinolytischen System, besonders der Serinprotease Urokinase Plasminogen Aktivator und ihrem spezifischen Rezeptor uPAR, grosse Bedeutung zu (2). Migrierende Zellen sind durch eine gesteigerte uPAR Expression sowie deren Polarisierung am führenden Zellende gekennzeichnet. Komponenten dieses Systems wurden in atherosklerotischen Läsionen immunhistochemisch nachgewiesen (3, 4) uPA und uPAR sind ein multifunktionelles System, das die Zellproliferation induziert und die Migration von Zellen durch Vermittlung von exakt gesteuerter extrazellulärer Proteolyse, Chemotaxis, Induktion von Zelladhäsion/-deathänsion und Aktivierung der Genexpression fördert (5, 6).

Inwieweit eine chronische diabetische Stoffwechsellage Einfluss auf die Regulation der Komponenten des Urokinase Plasminogen Aktivator Systems hat, ist bisher nicht bekannt. Untersuchungen darüber könnten Ansatzpunkte zur Klärung des komplexen pathogenetischen Zusammenhanges zwischen Arteriosklerose und metabolischem Syndrom liefern und damit eine Grundlage für die Entwicklung zielgerichteter Therapien schaffen.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war daher die Untersuchung des Einflusses von verschiedenen Fettsäuren auf die Regulation des Urokinase Plasminogen Aktivator Rezeptors in Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)-ausdifferenzierten Monozyten einer humanen Monozyten-/Makrophagenzelllinie (U-937) *in vitro* auf transkriptionaler und posttranskriptioneller Ebene. Anhand des Einsatzes spezifischer Inhibitoren waren die an der Signalübermittlung beteiligten Signalwege zu identifizieren und zu beschreiben. Weiterführend wurde untersucht, inwieweit metabolische Faktoren wie zum Beispiel freie Fettsäuren das metabolische Profil in der untersuchten Zelllinie verändern. In einem kleinen Kollektiv gesunder Probanden wurden die Kurzzeiteffekte gesättigter Fettsäuren auf die Expression von uPAR *in vivo* untersucht. Die Durchführung der semiquantitativen Analysen der mRNA- und Proteinkonzentrationen erfolgte mittels RT-PCR bzw. Western Blot.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1. Arteriosklerose

2.1.1. Definition und Prävalenz

Nach der Definition der WHO von 1957 versteht man unter Atherosklerose die „variable Kombination von Intimaveränderungen, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalkablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia“ (7).

Dabei werden derartige Veränderungen jedoch nicht als einfacher altersbedingter Degenerationsprozeß, sondern vielmehr als chronisch entzündliches Geschehen betrachtet, welches jeder Zeit in ein akutes klinisches Ereignis übergehen kann. Plaquerupturen und Thrombosen sind die Ursachen für Myokardinfarkt, Apoplex und Funktionsverlust der Extremitäten (Gangrän). Bis zu 50% der Gesamtmortalität gehen in den USA, Europa und Japan auf Atherosklerose zurück. Nach Schätzungen der American Heart Association sind 57 Millionen Amerikaner von kardiovaskulären Erkrankungen betroffen. 954,000 Amerikaner versterben jährlich an ihren Folgen (8).

2.1.2. Pathogenese

In der heute gebräuchlichen „*response to injury*“- Theorie wird von einer primären Endothelschädigung ausgegangen. Es bleibt strittig, wodurch diese Läsionen direkt hervorgerufen werden. Eine Reihe von Risikofaktoren wie Rauchen, Hyperlipoproteinämie, Typ 2 Diabetes und andere noch nicht identifizierte Faktoren tragen zur Endothelschädigung bei. Das gesunde Endothel fungiert mit seinen interzellulären tight junctions als selektive permeable Barriere zwischen Blut und Gewebe. Es hat sowohl sensorische als auch Schutzfunktionen und kann Effektormoleküle produzieren, die an der Regulation von Thrombosen (uPA, tPA, PAI-1, PAI-2), Entzündung, Gefäßtonus (Endothelin, Prostazyklin, NO) und Gefäßumbau beteiligt sind. In Kurven und an Aufzweigungsstellen der Arterie wirken auf die Endothelzellen besonders hohe, durch den dort nicht mehr laminaren, sondern vielmehr unruhigen Blutfluß bedingte, Scherkräfte ein, die ihrerseits zu Veränderungen der Morphologie führen (9). Die Zellen sind in diesen Bereichen nicht mehr ausgerichtet. Die

Permeabilität für Makromoleküle, wie LDL und andere ApolipoproteinB- enthaltende Lipoproteine (Lipoprotein a, Remnants) ist erhöht, welches sie zu Präferenzstellen für die Initiation des pathologischen Geschehens macht (10). Weiterhin wird die Kontaktzeit der Makromoleküle mit den Endothelzellen der Gefäßwand erhöht, auch die Kontaktzeit der Monozyten wird durch die Turbulenzen erhöht, welches eine Reihe von Folgeeffekten nach sich zieht (11).

Scherkräfte per se führen des weiteren zur Bildung von Effektormolekülen, die unter dem Begriff „*shear stress response elements*“ zusammengefasst werden können. Zu ihnen zählen MCP-1, tissue factor, Endothelin-1 und Adhäsionsmoleküle (12). Vor allem Selektine vermitteln den zunächst temporären Kontakt von Monozyten und Lymphozyten mit dem Endothel. Die Expression von CAM's (Cellular Adhesion Molecules) führt zu einer festen Anheftung der Zellen an die Gefäßwand (13).

Schreitet das Geschehen weiter fort, entstehen auf dem Boden der Endothelzellfunktion sog. *fatty streaks*, die frühen atherosklerotischen Plaques. Bereits in der ersten Lebensdekade finden sich derartige Läsionen in der Aorta (14).

Natives LDL diffundiert passiv durch die extrazellulären tight junctions und wird in der subendothelialen Schicht modifiziert. Zu diesen Modifikationen gehören Oxidation, Lipolyse, Proteolyse und Aggregation. Vor allem Monozyten dringen in den subintimalen Raum ein. Dieser Prozess wird durch Chemokine, z.B. MCP-1, vermittelt (15). Es erfolgt die Differenzierung in Makrophagen. Besonders dem M-CSF wird in diesem Prozess große Bedeutung zugesprochen (13). Oxidiertes LDL wird von Makrophagen über Scavenger-Rezeptoren aufgenommen. Besonders die Rezeptoren SR-A und CD36 scheinen in diesem Zusammenhang von klinischer Relevanz zu sein (14). Makrophagen, die oxidierte LDL-Partikel phagozytiert haben, werden als Schaumzellen bezeichnet, welche die charakteristischen Zellen der arteriosklerotischen Plaque darstellen (13). Durch die Bindung von modifiziertem LDL an die Scavenger Rezeptoren wird eine Reihe von Ereignissen in Gang gebracht (16). Dazu gehören die Sekretion von inflammatorischen Zytokinen (IL-1, TNF- α , TGF- β), Wachstumsfaktoren (PDGF-1, IGF-1) und die Induktion von hydrolytischen Enzymen (Metalloproteinasen, Urokinase).

Makrophagen sind Antigen- präsentierende Zellen. Ein potentiell Antigen ist oxidiertes LDL. Über eine Antigenpräsentation werden CD4⁺- und CD8⁺ T-Lymphozyten angelockt, die sich ebenfalls in allen Stadien der Pathogenese finden lassen. Über Zelladhäsionsmoleküle, besonders über die Adhäsion an VCAM-1, gelangen sie in die Intima.

Neben der Antigenpräsentation werden Lymphozyten zusätzlich über Chemokine angelockt. Selektiv auf Lymphozyten wirkt ein Trio aus Interferon- γ aktivierbaren Chemokinen. In der Intima treffen Antigen (z.B. oxLDL, HSP) und Antikörper aufeinander, es wird von Lymphozytenaktivierung gesprochen. Die Aktivierung führt zur Sekretion weiterer Zytokine wie TNF- α und - β , sowie Interferon γ , Il-1, -4 und -10, die ihrerseits den Entzündungsprozeß unterhalten und weitere Lymphozyten rekrutieren. Aktivierte T-Lymphozyten exprimieren den CD40-Liganden (CD40L oder CD154), der an seinen Rezeptor CD40 bindet. Dieser Rezeptor wird beispielsweise auf Makrophagen, B-Lymphozyten, Endothel- und glatten Muskelzellen exprimiert. In Endothel- und glatten Muskelzellen bewirkt die Bindung von CD40L an seinen Rezeptor einerseits die Ausschüttung großer Il-6 Mengen, andererseits die verstärkte Expression von CD40. Diesem System (CD40-CD40L) wird in jüngster Zeit eine besondere Relevanz zugesprochen. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Unterbrechung der durch CD40 ausgelösten Signalwege zu einer verminderten Atherombildung bzw. zum verlangsamten Fortschreiten der Plaqueformation führt. Weiterhin zeichnen sich diese Plaques durch erhöhte Stabilität aus (15).

Modifiziertes LDL wirkt zusätzlich direkt chemotaktisch auf andere Monozyten und kann die Expression von M-CSF und MCP-1 in Endothelzellen erhöhen, so dass die Rekrutierung neuer Monozyten an den Ort der Entzündung sowie deren Differenzierung gewährleistet wird. Oxidiertes LDL kann weiterhin die Produktion von NO, einem potenter Vasodilatator mit zusätzlich antiinflammatorischen Eigenschaften (17), inhibieren und die Expression von ELAMs (endothelial leucocyte adhesion molecules) induzieren. Unter ihnen spielen bei der Leukozytenrekrutierung vor allem ICAM-1, P-Selectin, E-Selectin, PCAM-1 und VCAM-1 eine Rolle, bei der Monozytenrekrutierung vor allem β 2-Integrin, VLA-4 und PCAM-1 (14). In der fortgeschrittenen Läsion akkumulieren zu Schaumzellen transformierte Makrophagen und T-Lymphozyten.

Die von T-Lymphozyten und Makrophagen sezernierten Zytokine und Wachstumsfaktoren sind entscheidend für die Migration und Proliferation glatter Muskelzellen und die Produktion von ECM. Die Migration glatter Muskelzellen wird besonders durch PDGF, FGF-2 und TGF- β stimuliert (16). Außerdem sind glatte Muskelzellen und Endothelzellen selbst in der Lage Zytokine und Wachstumsfaktoren zu produzieren und damit gemeinsam mit den aktivierten Makrophagen und T-Lymphozyten den Entzündungsprozeß zu unterhalten(18).

Die sich gegenseitig verstärkenden Mechanismen, Akkumulation von mononukleären Zellen, Migration und Proliferation von Muskelzellen und die Bildung von extrazellulärer Matrix, die

schließlich fibrosiert, führen letztendlich nur zu einer Vergrößerung der Läsion, die dann in sich strukturiert ist. In der fortgeschrittenen Läsion findet sich durch Apoptose phagozytischer Zellen ein mittelständiger nekrotischer Kern, der von freigesetzten Lipiden ummantelt ist und seinerseits von einer fibrotischen Kappe bedeckt ist. Die fibrotische Kappe grenzt die arteriosklerotische Läsion gegenüber dem zirkulierenden Blut ab (16). Über verschiedene Kompensationsmechanismen (z.B. arterielle Dilatation) kann die Hämodynamik relativ lange aufrechterhalten werden, wobei schon früh (noch vor dem Plaque) endotheliale Funktionsstörungen nachweisbar sind. Diese Mechanismen versagen jedoch irgendwann, so dass die Läsion dann hämodynamisch wirksam ins Lumen ragt.

Da verschiedene Ab- und Umbauvorgänge parallel zueinander ablaufen und sich gegenseitig beeinflussen, kann es im weiteren Krankheitsgeschehen zur Instabilität der Plaques kommen. T-Lymphozyten, beispielsweise, die in allen Stadien des Krankheitsgeschehens präsent sind, können mit dem von ihnen sezernierten Interferon- α die Bildung von ECM durch glatte Muskelzellen hemmen (19). Durch die Ausschüttung von Matrixmetalloproteinasen (Kollagenasen, Elastasen und Stromelysine (=MMP-3)) und Plasmin aus Makrophagen und Schaumzellen wird die fibrotische Kappe ausgedünnt, und die Gefahr einer Thrombose steigt. Die fibröse Kappe kann unter dem Einfluss von Scherkräften aufreißen. Der thrombogene Lipidkern der Plaque und Kollagen der Gefäßwand werden freigelegt.

Im Gesamtgeschehen der Atherosklerose ist weiterhin die Rolle der Thrombozyten zu betrachten. Durch die Schädigung des Gefäßendothels wird Kollagen freigelegt, welches über eine ADP-Freisetzung die Plättchenaggregation bewirkt. Die Aktivierung der Thrombozyten bewirkt einerseits die Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, welche die Migration von glatten Muskelzellen und Monozyten stimulieren, aber auch weitere Thrombozyten anlocken. Andererseits wird aus Phospholipiden der Thrombozytenmembran freie Arachidonsäure abgespalten, welche die Ausgangssubstanz für die Synthese von Prostaglandinen und Leukotrienen bildet. Das wohl bekannteste dieser Prostaglandine, Thromboxan A₂, verstärkt seinerseits die Thrombozytenaggregation und ist zudem ein äußerst potenter Vasokonstriktor. Die entstehenden Leukotriene haben chemotaktische Eigenschaften und wirken zudem vasoaktiv. Sie fördern die Gefäßpermeabilität. Alle, bei der Blutstillung sehr sinnvollen, Systeme tragen in diesem Zusammenhang zur Progression des pathologischen Geschehens bei (16).

2.2. Das Plasminogenaktivatorsystem

Charakteristisches Merkmal der Atherosklerose als chronisch degenerative, entzündliche Erkrankung der Gefäßwände ist die Infiltration von Monozyten aufgrund der Stimulation durch pro-atherogene Substanzen wie oxidierten Fetten (20). Die Rekrutierung von phagozytierenden Zellen an den Ort der Entzündung erfordert die Degradation von Proteinen der Basalmembran und extrazellulären Matrix. Diese Abbauprozesse werden in erster Linie durch verschiedene zelloberflächenassoziierte proteolytische Systeme gewährleistet. Diese Systeme zeichnen sich durch das Vorkommen von inaktiven Proteinase-Vorstufen (Proenzyme oder Zymogene) aus. Die Aktivierung erfolgt in einer kaskadenförmigen Abfolge von proteolytischen Prozessen, wie sie zum Beispiel während der Blutgerinnung oder Komplementaktivierung abläuft.

Das Degradom (Gesamtheit aller Proteasen einer Spezies) des Menschen umfasst mindestens 553 Proteasen, die sich hinsichtlich ihrer Mechanismen der Peptidspaltung, ihrer Lokalisation und ihren Zielsubstraten unterscheiden. Gebräuchlich ist eine weitere Unterteilung der Proteinase in 5 Hauptklassen: so sind bisher 21 Aspartatproteinase, 143 Cysteinproteinase, 186 Metalloproteinase, 27 Threoninproteinase, sowie 176 Serinproteinase bekannt (21). Die Proteinase des Plasminogenaktivatorsystems (Plasmin, Urokinase-Typ Plasminogenaktivator (uPA), und Tissue-Typ Plasminogenaktivator (tPA) werden zur Klasse der Serinproteinase gerechnet.

Das Plasminogenaktivatorsystem ist an einer Reihe von physiologischen Gewebeabbau- und Umbauvorgängen wie Trophoblasteninvasion (22), Wundheilung (23), Mammainvolution nach der Laktation (24), Spermatogenese (25) und Embryogenese (26) beteiligt. Auch bei vielen pathologischen Prozessen stehen Gewebeab- und -umbau im Vordergrund. Bei verschiedenen benignen Prozessen wie Atherosklerose (27), Angiogenese (28), Endometriose (29), Hauterkrankungen (30) und auch besonders in der Tumordinvasion und Metastasierung (28) konnte eine Beteiligung des Plasminogenaktivatorsystems nachgewiesen werden.

Das Plasminogenaktivatorsystem setzt sich aus den Komponenten Plasminogen, einem Serinproteasezymogen, der aktiven Serinprotease Plasmin, den Aktivatoren uPA und tPA, dem zellulären Rezeptor uPAR, sowie den zur Serpinfamilie gehörenden Plasminogenaktivatorinhibitoren 1 und 2 (PAI) zusammen. Weitere Inhibitoren für uPA sind der Protein-C-Inhibitor (PCI), der manchmal auch als PAI-3 bezeichnet wird, sowie die

Protease Nexin-1 (PN-1). Auch die Plasminaktivität unterliegt ihrerseits einer direkten Regulation. α_2 -Antiplasmin stellt wohl den wichtigsten Antagonisten für Plasmin dar (31). Der Rezeptor für uPA, uPAR spielt bei der Plasmingenerierung eine zentrale Rolle. Eine Fokussierung proteolytischer Enzymaktivität wird durch die Bindung von uPA, bzw. dessen Zymogen pro-uPA an die Zelloberfläche ausgelöst (31, 32). uPAR findet sich vor allem im führenden Teil von migrierenden Zellen (33, 34). Er konvertiert pro- Urokinase in seine aktive Form - Urokinase, welche dann Plasminogen zur aktiven Form, Plasmin konvertieren kann. Plasmin degradiert seinerseits Proteine der extrazellulären Matrix.

2.2.1. Der Urokinase-Typ Plasminogenaktivator-Rezeptor (uPAR, CD87)

Der Urokinase- Typ Plasminogenaktivator- Rezeptor wurde als spezifischer Rezeptor für uPA (Urokinase –Typ Plasminogenaktivator) erstmals im Jahre 1985 auf humanen Monozyten sowie der promyeloiden Leukämiezelllinie U937 nachgewiesen (33, 35). Wegen der 1992 entdeckten Sequenzidentität der uPAR- cDNA mit der des Makrophagendifferenzierungsantigens Mo3 wird es auch als CD 87 (Cluster of Differentiation) bezeichnet (36). Die humane uPAR cDNA codiert ein aus 335 AS bestehendes Polypeptid.

Der uPAR ist ein Glycophosphatidylinositol (GPI)-verankertes Glykoprotein.

Dieser GPI-Anker wird während der posttranslationalen Modifikation nach Abspaltung eines 22 AS langen NH₂ terminalen Signalpeptides sowie nach Abspaltung von 30 COOH-terminalen Aminosäuren (AS) am so entstandenen neuen C-Terminus des uPAR (nun 283 AS enthaltend) im endoplasmatischen Retikulum befestigt (37). Der uPAR ist über den GPI-Anker mit der Plasmamembran verbunden und besitzt keine membrandurchspannende und somit auch keine zytoplasmatische, d.h. intrazelluläre, Domäne. Das bedeutet jedoch keinesfalls, dass sich die Beteiligung des uPAR ausschließlich auf extrazelluläre Signalwege beschränkt. Er wird vielmehr auch mit einer Reihe von zellulären Signaltransduktionen in Verbindung gebracht (38). Über die Bindung an transmembrane Signaladaptoren, wie Integrinen, Caveolin und transmembranen Rezeptoren, kann uPAR eine Reihe von Signalwegen aktivieren (39, 40).

Neben der GPI-verankerten Form ist des weiteren eine lösliche Variante des uPAR, soluble uPAR, bekannt. Diese wurde erstmals im Plasma von Patienten mit der seltenen Erkrankung der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie isoliert (41) Auch im Plasma von gesunden

Patienten ist s-uPAR nachweisbar, so dass von einer alternativen Splicevariante ausgegangen wird (42). Die dreidimensionale Struktur des uPAR ist bis heute unbekannt. Bekannt ist, dass der Rezeptor aus einer Einzelpolypeptidkette mit drei extrazellulären Domänen besteht. Wegen seiner Struktur wird der uPAR der Ly-6 / uPAR/ α -Neurotoxin Proteinsuperfamilie zugeordnet. Er ist bisher das einzige Multidomänenmitglied dieser Familie (43, 44).

In Studien konnte eine Sequenzhomologie zwischen den drei Domänen (D1, D2, D3) nachgewiesen werden, wobei der oben beschriebene GPI-Anker mit der 3. Domäne assoziiert ist. Die hauptsächliche Bindungsstelle für uPA liegt in Domäne 1. Wird jedoch die Domäne 1 aus dem Rezeptorprotein isoliert, sinkt die Bindungsaffinität für uPA um das 100- bis 1000-fache. Nach proteolytischer Abspaltung der 3. Domäne und isolierter Betrachtung des Bindungsverhaltens von uPA an die übrig gebliebenen Domänen 1 & 2 beobachtet man den gleichen Effekt, so dass heute davon ausgegangen wird, dass die Intaktheit des Proteins über eine Konformationsausrichtung für die Domäne 1 eine Voraussetzung für optimale Bindungsstabilität und Affinität von uPA an seinen spezifischen Rezeptor darstellt (45).

Der uPAR ist ein hochglykosyliertes Protein mit einem vom Glykosylierungsgrad abhängigen und deshalb äußerst heterogenen Molekulargewicht zwischen 45 und 60 kDa (32). Von 5 potentiellen N-Glykosylierungsstellen sind nur vier mit Oligosacchariden verknüpfbar (44). Das Glykosylierungsprofil ist äußerst heterogen und in verschiedenen Zelltypen stark variabel (45). Nach vollständiger *in vitro* Deglykosylierung besitzt der Rezeptor ein Molekulargewicht von 35 kDa, verliert dann allerdings seine Fähigkeit uPA zu binden, so dass die Glykosylierung zumindest für die funktionelle Aktivität des uPAR gegenüber uPA essentiell zu sein scheint (46).

Die uPAR-Expression unterliegt einer feinen Regulation. Als anerkannte Stimulatoren gelten FGF- β , TNF- α , Endothelin-1, TGF β 1, EGF, PDGF, α -Thrombin und Interferon (34).

2.2.2. uPA

Die 53 kDa Serinprotease uPA katalysiert die Konversion von Plasminogen zu Plasmin. Strukturell kann uPA in drei Hauptdomänen unterteilt werden: eine N-terminale Domäne (ATF), welches die Bindungsstelle für uPAR darstellt, eine Kringel-Domäne mit bisher unbekannter Funktion, sowie eine C-terminale Sequenz mit katalytischer Aktivität. Im Gegensatz zu den meisten ECM-degradierenden Enzymen zeichnet sich uPA durch seine hohe Substratspezifität aus (47).

Die Bindung von uPA an seinen Rezeptor hat neben der Plasmingenerierung noch weitere Effekte. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass uPA Knock-out Mäuse die Fähigkeit verlieren, T-Zellen und Makrophagen an den Ort bakterielle Entzündung zu rekrutieren. Seither wurde dem uPA/uPAR- System ein direkter Einfluss auf die Zellmigration nachgesagt, 1999 konnten im System chemotaktische Eigenschaften nachgewiesen werden. Ein chemotaktisches Epitop an der Verbindungsstelle D1 und D2 des uPAR wird über eine durch die uPA- Bindung ausgelöste Konformationsänderung demaskiert. Dieses Epitop ist in der Lage, intrazelluläre Tyrosinkinasen zu aktivieren (48).

uPA wird als Proenzym, pro-uPA, mit geringer proteolytischer Aktivität sezerniert. Es kann durch Plasmin aktiviert werden. Durch diesen positiven Feedbackmechanismus arbeitet das System außerordentlich effektiv.

Auch andere Proteasen sind in der Lage, pro- uPA zu aktivieren: Plasma Kallikrein, mGK (murine glandular kallikrein), prostatic kallikrein (hK2), Mastzelltryptase, NGF γ (nerve growth factor gamma), die Cathepsine B, M, L und weitere, wie die Serinproteasen Matriptase und HuTSP-1 (28, 45). In vitro können all diese Aktivatoren die PA Kaskade in Gang bringen, in vivo ist das nicht der Fall. Man geht wegen dieses Umstandes davon aus, dass dafür eine Reihe teilweise nicht identifizierter Kofaktoren benötigt werden.

2.2.3. Plasmin

Das durch uPA aktivierte Plasmin wird ebenfalls zur Klasse der Serinproteasen gerechnet, unterscheidet sich doch jedoch durch seine mangelnde Substratspezifität deutlich von uPA. Neben nativem Kollagen und Fibrin kann Plasmin auch die meisten in der ECM vorkommenden Proteine degradieren. Dazu gehören Fibronectin, Laminin und Vitronectin (45). Außerdem aktiviert es die Vorstufen verschiedener Matrixmetalloproteinasen wie MMP-3, MMP-9, MMP12, MMP-13 sowie das Zymogen Prokollagenase. Diese Aktivierung führt zu einem weiteren Abbau und reaktiven Umbau der Basalmembran und extrazellulären Matrix.

Erwähnenswert ist weiterhin, dass durch Plasmin die Produktion und Ausschüttung verschiedener Wachstumsfaktoren wie HGF, IGF-1, FGF-2 und TGF- β angeregt wird. Folgeeffekte dabei sind die Freisetzung von PAI-1 und uPA, die Neusynthese extrazellulärer Matrix, sowie die vermehrte Expression von uPAR und Urokinase in verschiedenen Zelltypen (28, 47, 49).

2.2.4. Serinproteaseinhibitoren

Die Serinproteaseinhibitoren PAI-1, PAI-2 und die Protease Nexin-1 (PN-1) stellen die Hauptantagonisten der katalytischen Aktivität von uPA dar (45).

PAI-1 hemmt einerseits direkt die Bindung von uPA an uPAR, in dem es stöchiometrisch 1:1 Komplexe mit uPA bildet. Es kann darüber hinaus sogar die Internalisierung und Degradierung von uPAR- gebundenem uPA bewirken. Die Internalisierung erfolgt über eine Wechselwirkung mit dem low density lipoprotein (LDL)-Rezeptor related Protein. Das internalisierte uPAR kann dann in einer Art Recyclingmechanismus wieder auf der Zelloberfläche exprimiert werden.(38) Während dieses Prozesses kann uPAR mit zahlreichen Adaptermolekülen in Verbindung treten und so zusätzlich Einfluss auf die Zellmigration nehmen (34). PAI-1 beeinflusst des weiteren die uPAR- vermittelte Adhäsion und Zellmigration, in dem es selbst das ECM-Protein Vitronektin binden kann und somit einerseits die uPAR-VN-Bindung hemmt, andererseits wird durch Vn-PAI-1 Komplexbildung PAI-1 in seiner aktivierten Form stabilisiert. Vn-PAI-1-Komplexe sind immer noch in der Lage uPA effektiv zu binden und somit zu inaktivieren (50).

Auch die Bindung von VN an $\alpha_v\beta_3$ –Integrin wird durch PAI-1 inhibiert. Funktionell kann PAI-1 die $\alpha_v\beta_3$ –Integrin vermittelte Zellmigration hemmen.

Adhäsion und Zellmigration stehen im Vordergrund bei der Tumormetastasierung. Den Komponenten des Plasminogenaktivatorsystems wird z.B. beim Mammakarzinom eine höhere prognostische Relevanz zugesprochen als anderen biologischen Markern wie Östrogen-Rezeptoren, p53, Her-2 und Cadhepsin D. Hohe PAI-1 und uPA Spiegel sind mit einem besonders aggressiven Tumorprogreß, insbesondere Invasivität und Metastasierung, assoziiert.

PAI-2 bindet uPAR in der gleichen Stöchiometrie wie PAI-1, reagiert jedoch wesentlich langsamer als PAI-1. Es gibt keine Hinweise darauf, dass PAI-2 an der Regulation von Zelladhäsion und –migration beteiligt ist. Die gleichzeitige Expression hoher uPA und PAI-2 Spiegel bei Mammakarzinompatientinnen korreliert im Allgemeinen mit einer günstigen Prognose. uPA- unabhängig werden PAI-2 jedoch anti-apoptotische und proliferationsfördernde Effekte nachgesagt (47).

Auch die PN-1 kann Vitronektin binden - allein, oder nachdem es uPA gebunden hat. Im Gegensatz zu PAI-1 verstärkt die PN-1 Bindung jedoch die Bindung von uPAR an VN in Anwesenheit von aktiviertem uPA. Mittels Co-Immunolokalisation und Zelladhäsionsassay konnte dies von Kanse et al. nachgewiesen werden. Diese Experimente wurden allerdings mit

der ankerlosen Form des uPAR (soluble uPAR) durchgeführt, so dass eine Aussage für die membrangebundene Variante noch aussteht.

Ähnlich wie für PAI-1 ist eine Internalisierung von uPAR durch PN-1 beschrieben, ebenfalls unter Beteiligung des LDL-Rezeptors related Protein (51).

2.3. Weitere Liganden des uPAR

2.3.1. Integrine

Integrine sind Zelloberflächenrezeptoren, die Zellen in der ECM verankern und an der Signalübertragung zwischen intra- und extrazellulär beteiligt sind. Über die Integrine findet eine Bindung an die ECM-Proteine Vitronectin, Fibronectin, Fibrinogen, Laminin und Kollagen statt.

Integrine sind aus einer α - und β - Untereinheit aufgebaut. Jede dieser Untereinheiten besteht aus einer langen extrazellulären Domäne (950-1100 AS) sowie einem kurzen zyttoplasmatischen Teil (15-77 AS), der mit dem Aktin des Zytoskeletts in Kontakt steht. Der Kontakt wird durch sog. Fokalkontakte intensiviert. Bestandteil der Fokalkontakte sind die Proteine Vinculin, Paxillin, Talin und Tensin. Sie koppeln Aktin an das Integrin an. Es sind mindestens 18 α und 8 β Untereinheiten bekannt, die mindestens 24 verschiedene Rezeptoren bilden können (52, 53). Um intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren zu können, müssen Integrine mit zyttoplasmatischen Elementen in Verbindung treten, da Integrine selbst, trotz einer kurzen intrazellulären Domäne, keine intrinsischen Signalkapazitäten aufweisen (54).

Die Bindung von Integrin an seine Liganden wird mannigfaltig reguliert.

Teil dieser dynamischen Regulation ist die Wechselwirkung von Integrinen mit benachbarten membranassoziierten Proteinen, unter ihnen auch Caveolin und uPAR.

uPAR bildet Komplexe mit Integrinen. Diese Komplexbildung spielt eine wichtige Rolle bei der uPAR -abhängigen Adhäsion an das Matrixprotein Vitronectin. uPAR/ β 1-Integrinkomplexe werden hierbei durch Caveolin stabilisiert, wie in der Studie von Wei et al. 1999 gezeigt werden konnte. In uPAR und Caveolin überexprimierenden HEK293 (human embryonic kidney) Zellen konnte gezeigt werden, dass eine verminderte Caveolinexpression die Bindung an Vitronectin unmöglich macht (54).

Zunächst wurde eine Assoziation mit dem β_2 - Integrin Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$) beschrieben, ein Leukozyten-Integrinrezeptor, der Fibrinogen bindet. Bei der β_2 Integrin-vermittelten Leukozytenadhäsion spielt uPAR die entscheidende Rolle (55).

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass uPAR mit vielfältigen Integrinen assoziiert sein kann, so auch mit β_1 und β_3 -Integrinen. Die höchsten Affinitäten scheinen für die Fibronectin-Integrinrezeptoren $\alpha_3\beta_1$ und $\alpha_5\beta_1$ zu bestehen. Des Weiteren gibt es Hinweise auf eine Assoziation mit $\alpha_v\beta_5$ und $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen, die Vitronectin binden (38).

Ist der uPAR aktiviert, d.h. mit einem Liganden gebunden, beeinflusst er die Integrin-abhängige Zelladhäsion, Migration und Proliferation (38).

2.3.2. Vitronectin

Über eine direkte Bindung an Vitronectin (Vn) kann uPAR die Integrin-unabhängige Zelladhäsion vermitteln. Vitronectin ist ein zirkulierendes Plasmaprotein, welches auch extrazellulär vorkommt. Im Plasma stellt es das Hauptbindungsprotein für PAI-1 dar. 1994 wurde von Wei et al. erstmals die Bindung von Vitronectin an uPAR beschrieben, die interessanterweise durch Zn^{2+} erhöht werden kann. Bei der uPAR- Bindung spielt die NH_2 -terminale Somatomedin B Domäne von Vitronectin die entscheidende Rolle. PAI-1 und uPAR konkurrieren um die Vn- Bindungsstelle (56).

An Stellen von Entzündung und Verletzung kann das extrazelluläre Glykoprotein Vitronectin ein Substrat für Zelladhäsion und Migration darstellen (57, 58).

Proteolytische Enzymsysteme, Zellmigration und Gefäßumbau werden über Vn reguliert. In arteriosklerotisch veränderten Gefäßen konnte mittels Immunhistochemie eine erhöhte Ablagerung von Vitronectin nachgewiesen werden (59).

Ähnlich wie bei der Bindung von uPA scheint die Expression aller drei homologen Domänen des uPAR eine besondere Rolle zu spielen. Die Vitronectin- Hauptbindungsstelle liegt in Domäne 1. Die Affinität wird jedoch durch Intaktheit des Proteins stark erhöht (57).

Des Weiteren wird die Bindungsaffinität von uPAR an Vitronectin dadurch gesteigert, dass uPA bereits an uPAR gebunden ist. Wodurch die uPA- uPAR Komplexe die Bindungsbereitschaft erhöhen ist jedoch bisher unbekannt (45).

Die Bindung von uPAR an Vn induziert wirkungsvoll eine Umstrukturierung des Actin Zytoskeletts und verändert die Zellmotilität in einem Mechanismus, der eine Rac-Aktivierung voraussetzt.

Die uPAR- vermittelte Vn- Adhäsion ist in verschiedenen Zelltypen wie z.B. Monozyten, Fibroblasten, Epithel- und glatten Muskelzellen beschrieben (50).

2.3.3. Sonstige Liganden

Neben den bisher dargestellten uPAR- Proteininteraktionen bestehen noch zahlreiche weitere Verbindungen. Als extrazelluläre Liganden gelten High molecular weight kininogen (Hka) (60), Thrombospondin (61), der α 2-Makroglobulinrezeptor (62), uPARP (ein Mitglied der Makrophagen-Mannose-Rezeptor-Proteinfamilie) (63), sowie der Kationen- unabhängige Mannose-6-Phosphat/ Insulin- like growth factor II-Rezeptor (64). Durch Interaktionen mit diesen Proteinen werden zahlreiche weitere Phänomene beobachtet.

2.4. Signaltransduktion und transmembrane Adaptoren

Obwohl der uPAR wie bereits erwähnt keine intrazelluläre Domäne besitzt, ist er in der Lage, intrazelluläre Signalkaskaden zu aktivieren. Dafür kann uPAR transmembranäre Adaptoren benutzen. Über Gi- gekoppelte Proteine, EGF- Rezeptor Transaktivierung und die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Proteinkinasen wie PKC ϵ , Src, JAK-STAT, p125-FAK, PI-3Kinase, Ras/Raf, ERK1/2 MAPK und Ras/ERK werden verschiedenste Signalkaskaden aktiviert (65). Welche Gene dadurch differentiell exprimiert werden, ist nicht endgültig geklärt.

2.4.1. PKC

uPAR ist mit interzellulären Signalproteinen assoziiert, u.a. mit der ϵ - Isoform der Proteinkinase C (PKC ϵ). Sie kann das GTP- Bindungsprotein Ras aktivieren. Ergebnis dieser Aktivierung ist die Translokation der Proteinkinase Raf in die Plasmamembran. Durch Phosphorylierung wird diese dort aktiviert. Raf aktiviert dann die MAP (mitogen- activated protein) Kinase -Kaskade. Neben anderen Proteinkinasen können auch Transkriptionsfaktoren aktiviert werden, die dann die Zellproliferation und Migration beeinflussen. Die MAP-Kinase -Isoformen ERK1/2 können beispielsweise die Transkriptionsfaktoren Elk-1 und Sap-1 stimulieren und über diesen Weg die Expression von AP-1 induzieren. Auf diesem Wege ist dann die Modulation von Genen zur Regulation der Zellproliferation möglich (34, 66).

2.4.2. NRTK (Nicht-Rezeptor Tyrosinkinasen)

Mit verschiedenen Nichtrezeptortyrosinkinasen der Src- Familie, z.B. p60^{fyn}, p53/56^{lyn}, p58/64^{hck} und p59^{fgfr} kann uPAR assoziiert sein und einige von ihnen aktivieren (34, 66, 67). Wahrscheinlich dienen bei diesem Signalweg bestimmte Proteine der Caveolen als Adaptermoleküle. NRTK's können durch intramolekulare SH2-Domänen (Src homology 2) Adaptermoleküle, beispielsweise Shc (Src homology/collagen protein) aktivieren. Diese assoziieren mit anderen Adaptermolekülen, wie Grb2 (growth-factor- binding protein-2). Eine bestimmte Domäne innerhalb des Grb2 Moleküls erkennt und aktiviert prolinreiche Sequenzen im C-Terminus des Ras Exchange Faktor Sos (Son of sevenless). Sos aktiviert das GTP- Bindungsprotein Ras, und im Verlauf kann so die Raf/Map-Kinasekaskade aktiviert werden (66). Über diesen Signalweg kann die MLCK (Myosin Leichte Ketten Kinase) aktiviert werden. Diese Ca²⁺/Calmodulinabhängige Kinase kann über Phosphorylierung innerhalb des Myosinmoleküls zur Kontraktion des Aktinskeletts führen.

2.4.3. Integrine und Signaltransduktion

Über die Regulation der intrazellulären Tyrosinkinase FAK (focal adhesion kinase) erfolgt die Beeinflussung der integrinabhängigen Zelladhäsion und Migration unter Beteiligung der Tyrosinkinase Src (68, 69).

Durch Integrin- uPAR Wechselwirkungen kann die Proliferation von Zellen über Aktivierung von ERK/MAPK 1/2 (extracellular- signal- regulated kinase/ mitogen- activated protein kinase) und Inhibierung von p38 MAPK beeinflusst werden. Dies setzt jedoch eine direkte Wechselwirkung von uPAR mit $\alpha_5\beta_1$ Integrinen voraus, welche in Anwesenheit von großen uPAR- Mengen dann die Rezeptoren für FAK und EGF aktivieren (38).

2.4.4. Caveolin

Caveolin ist ein 21 kDa transmembranes Phosphoprotein, welches als Komplex verankert mit GPI-gebundenen Proteinen, G-Proteinen und NRTK's der Src-Familie gefunden wurde (66). 1996 konnten mittels Coimmunopräzipitation erstmals Komplexe aus β_1 -Integrinen, Caveolin und uPAR in uPAR transfizierten HEK293- Zellen nachgewiesen werden. Eine verminderte Caveolinexpression führte zu einer Störung der uPAR und β_1 -Integrinvermittelten

Zelladhäsion (54). Caveolin ist assoziiert mit dem Signalmolekül Ras, einem kleinen membranassoziierten GTP-Bindungsprotein, welches im Verlauf die Serin/Threonin-spezifische Kinase Raf aktivieren kann (66).

2.4.5. Gp130

In der humanen epithelialen Nierentumorzelllinie TCL-598 wurde 1997 erstmals mittels Immunopräzipitation die Kolokalisation von uPAR mit dem Glykoprotein (gp) 130 in Caveolen beschrieben. Gp130 ist ein Zytokinrezeptor, der beispielsweise Il-6 als Transducer dient. In dieser Zelllinie fungiert gp130 vermutlich als transmembraner Adapter für uPAR, über den dann die Signaltransduktionswege JAK1/STAT1 aktiviert werden können (70). Weiterhin wurde auch die direkte Bindung von uPA an gp130 beobachtet. Über diese Bindung können die Tyrosinkinassen Src und JAK/Tyk sowie die Transkriptionsfaktoren der STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) Familie aktiviert werden, die beim Wachstum und der Differenzierung verschiedener Gewebearten eine besondere Rolle. Ob hierbei die uPA- uPAR- Komplexbildung eine Rolle spielt ist bislang nicht geklärt (40).

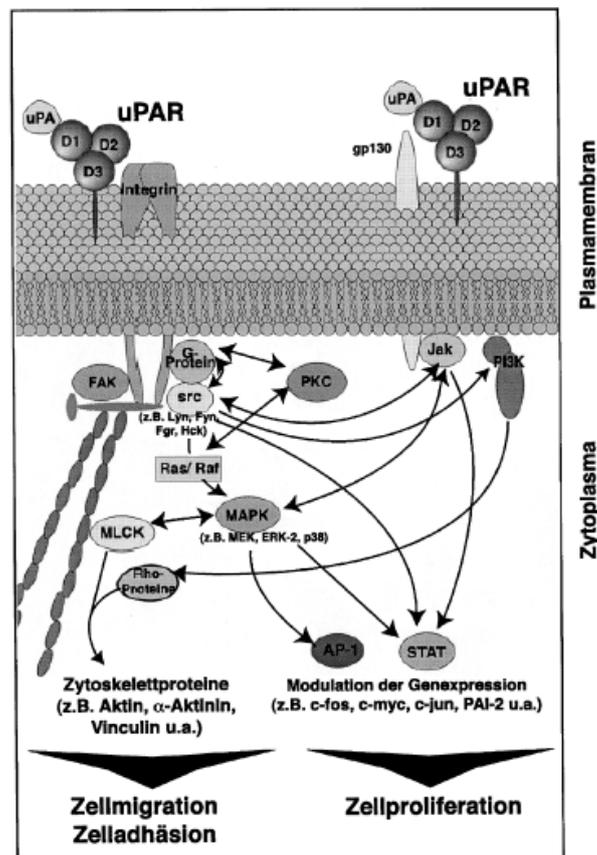


Abb.2.1: Darstellung der wichtigsten durch uPAR aktivierten Signalwege aus (34)

2.5. Die Bedeutung des uPAR bei der Atheroskleroseentstehung

Die Migration und Proliferation verschiedener Zelltypen stellen den Mittelpunkt der Atheroskleroseentstehung und des Krankheitsprogresses dar. Vor allem die Zellmigration ist als außerordentlich komplexes Geschehen anzusehen, bei dem verschiedenste Phänomene teilweise parallel zueinander und dennoch geordnet ablaufen müssen. Die Grundmechanismen der Zellmigration beinhalten Chemotaxis, eine Veränderung des Zellphänotyps (Reorganisation intrazellulärer Actin Steßfasern, Ausbildung von Lamellipodien), Zelladhäsion und –deathänsion sowie den Ab- und Umbau extrazellulärer Matrix.

Zellmigration erfordert die Koordination von Proteinen der ECM und des Zytoskeletts. Integrine spielen dabei eine wichtige Rolle als Rezeptoren der ECM. Verschiedene Proteine verbinden die zytoplasmatischen Integrinanteile mit dem Actin des Zytoskeletts. Dazu gehören Paxillin, Talin, α -Actinin und Filamin (69). Migrierende Zellen müssen die bestehende ECM Verankerung überwinden und müssen die neuen Verankerungsstellen am führenden Ende der Zelle exprimieren. Der Phänotyp muss zudem so geändert werden, dass viele neue, kurzlebige Kontaktstellen bereitgestellt werden. Ein zentrales Molekül in der Adhäsionsstabilität ist die Focal adhesion kinase (FAK). In verschiedenen Studien konnte eine Assoziation des uPAR in fokalen Kontaktstellen nachgewiesen werden. In einer Studie konnte in human airway smooth muscle cells (HASM) gezeigt werden, dass sowohl die Lokalisation als auch die Phosphorylierung von FAK durch Urokinase Stimulation verändert wird. Über verschiedene Zwischenschritte wird FAK aus der Membran entfernt, die Adhäsion beendet und die Migration der Zelle durch Chemotaxine ermöglicht (71). Über die chemotaktischen Eigenschaften des uPA/uPAR- System ist bereits unter 2.2.2 berichtet worden. Das Spektrum der bei der Arteriosklerose beteiligten Chemokine wurde in 2.1.2. vorgestellt.

In glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC, vascular smooth muscle cells) konnte eine direkte Beteiligung des uPA- uPAR- Systems an der Migration gezeigt werden, wie sie beispielsweise bei der Atherosklerose abläuft, wenn glatte Muskelzellen von der Media aus zur Intima wandern und dort proliferieren und Neointimaformierung und Restenose induzieren. Auch hierbei polarisiert uPAR ans führende Ende der Zelle und ist dort kolokalisiert mit der Jak1 und Tyk2-Tyrosinkinase. Die uPA- Bindung induziert eine schnelle Translokation von STAT1 in den Nukleus. Die dortige Aktivierung bestimmter

Transkriptionsfaktoren schafft die Voraussetzung für die Migration notwendigen Veränderungen des Zellphänotypes (72).

Die eigentliche Fortbewegung von Zellen wird über Kontraktions- und Dekontraktionsprozesse gesteuert. Eine entscheidende Rolle hierbei spielt die Phosphorylierung von Myosinmolekülen innerhalb des Zytoskeletts durch die MLCK (Myosin light chain kinase). UPAR vermag die MLCK zu aktivieren (73).

Mit anderen zytoskelettalen Strukturen (Vinculin, Actinin, Aktin) kann uPAR in Verbindung treten (74). Durch Assoziation und Phosphorylierung der FAK und deren assoziierter Proteine (Paxillin, p130^{cas}) kann auf einem weiteren Wege Einfluss auf Aktinzytoskelettstrukturen genommen werden (75). Parallel dazu kann das Zytoskelett durch Jak (Januskinase, Just another kinase) beeinflusst werden. Diese tritt in Wechselwirkung mit der Phosphatidylinositol-3-Kinase, welche maßgeblich an der Ausbildung von Lamellipodien beteiligt ist (33). Lamellipodien sind aus einem F-Aktin-Netzwerk bestehende blattartige Strukturen, die mit Zellmigration in Verbindung gebracht werden.

Wie bereits erwähnt kann uPA Matrixproteine wie Laminin und Fibronectin direkt spalten und proteolytisch inaktives Plasminogen zu Plasmin aktivieren. Plasmin kann dann direkt oder indirekt über die Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen Matrixproteine abbauen. uPA/uPAR induziert ferner die Expression von Kathepsin B und Gelatinasen, welche durch Degradierung der ECM ihrerseits essentielle Voraussetzungen zu Zellmigration schaffen.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Fluka AG, Neu-Ulm, D
2-Propanol	Merck KgaA, Darmstadt, D
Acrylamid	Merck KgaA, Darmstadt, D
Aktivkohle	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
APS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Bisacrylamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck KgaA, Darmstadt, D
Chloroform	Merck KgaA, Darmstadt, D
Coomassie Brillant Blue G-250	Serva Feinbiochemica, Heidelberg, D
D-(+)-Glucose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Dextran	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
DMPC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
DMSO	Merck KgaA, Darmstadt, D
Dodecylsulfat Natriumsalz	Merck KgaA, Darmstadt, D
DTT	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
EDTA (Titrplex III)	Merck KgaA, Darmstadt, D
Eisessig	Merck KgaA, Darmstadt, D
Ethanol	Merck KgaA, Darmstadt, D
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Glycin	Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, D
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Kaliumchlorid	Merck KgaA, Darmstadt, D
L-Arginin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
L-Glutamin	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Magnesiumsulfat	Merck KgaA, Darmstadt, D
Methanol	Merck KgaA, Darmstadt, D
Milchpulver, fettarm	EDEKA, Bergholz-Rehbrücke, D

Natriumchlorid	Merck KgaA, Darmstadt, D
Natriumdihydrogenphosphat	Riedel-de Haën AG, Seelze, D
Natriumhydrogencarbonat	Merck KgaA, Darmstadt, D
Natriumhydroxid	Merck KgaA, Darmstadt, D
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Ortho-Phosphorsäure 85%	Merck KgaA, Darmstadt, D
PBS	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Pyronin Y	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Salzsäure rauchend	Merck KgaA, Darmstadt, D
SeaKem® LE Agarose	Cambrex Bio Science Inc., Rockland, USA
Tavanic®	Aventis Pharma Deutschland GmbH, Frankfurt a.M., D
TEMED	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim,
Tris-Base	Merck KgaA, Darmstadt, D
Triton X-100	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm, D
Trizol®	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
TWEEN 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D

3.1.2. Biochemikalien

Abbolipid 20%	Abbott, Wiesbaden, D
Anti Hase IgG/HRP	Cell Signaling Technology Inc. New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M., D
Anti Ziege Immunglobulin/HRP	DakoCytomation GmbH, Hamburg, D
Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Biotinylated Protein Ladder Detection Pack	Cell Signaling Technology Inc.; New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.,
Bromoplamininsäure-Natrium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
BSA (Fraction V, Fatty acid free)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
d(N ₆) Primer	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
DNA-Leiter 100bp	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
DNA-Leiter 25bp	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D

DNA-Probenpuffer 6x	Fermentas GmbH, St. Leon-Roth, D
dNTP Set	Invitrogen GmbH Karlsruhe, D
Dynabeads® M-450, CD14	Dynal Biotech GmbH, Hamburg, D
FCS	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
GFX	Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, D
Heparin Calcium	Ratiopharm, Ulm, D
Konjugierte Linolsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
NycoPrep™1.077	Axis-Shield PoC AS, Oslo, N
Ölsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Palmitinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
PCR-Puffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Phototype-HRP Detection Kit for Western Blotting, anti Rabbit IgG	Cell Signaling Technology Inc. ;New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M., D
PMA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
PMSF	Merck KgaA, Darmstadt, D
Primer	Invitrogen GmbH Karlsruhe, D
Quanti Tect SYBR Green RT-PCR Kit	Qiagen GmbH, Hilden, D
Rekombinantes huPAR	R&D Systems GmbH, Wiesbaden, D
RNAsin	Promega GmbH, Mannheim, D
Rosiglitazon-Maleat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
RPMI 1640	Bio Whittaker Europe, Verviers, B
RT M-MuLV	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
RT-Puffer	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
SB 202190	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
SYBR green I	BMA, Bio Whittaker Molecular Applications, Rockland, USA
Taq DNA-Polymerase	Invitrogen GmbH Karlsruhe, D
Ziegen anti-huPAR Antikörper	R&D Systems GmbH, Wiesbaden, D

3.1.3. Verbrauchsmittel

Adhäsionsabdeckung für 384 Well-Platte	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Combitips plus (0,1; 5ml)	Eppendorf AG, Hamburg, D
Dialyseschlauch (molecularporous membrane tubing No.4)	Spectrum Chemicals & Laboratory Products, Gardena, USA
Einmalspritze Injekt (1, 2, 5, 10, 20ml)	B.Braun AG, Melsungen, D
Filter-Pipettenspitzen (10, 100, 1000µl)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, D
Micro-Testplatte (96 Well)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, D
Pasteurpipetten	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, D
Pipettenspitzen (10, 100, 1000 µl)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, D
PVDF-Membran Immobilon-P	Millipore GmbH, Schwalbach, D
Reagiergefäße (0,5; 1,5; 2,0 ml)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, D
Reaktionsplatte (384 Well)	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Röhrchen (15, 50ml)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, D
Rundbodenröhrchen 13ml	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, D
Serologische Pipetten (2, 5, 10, 25ml)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, D
Sterilfilter Filtropur S 0,2	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, D
Strip-Tubes 0,1ml für Rotor Gene	LTF-Labortechnik GmbH & Co. KG, Wasserburg, D
Whatman 3 MM Filterpapier	Whatman International Ltd., Maidstone, GB
Zellkulturflasche	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, D
Zellschaber 25cm	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, D
Zellkultur-Testplatte (6Well)	TPP AG, Trasadingen, CH

3.1.4. Geräte

Brutschrank	Heraeus , Düsseldorf, D
Cobas Mira	Roche, Indianapolis, USA
Eppendorf Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg, D
Gel Imager Fujifilm	Fuji Foto Film Co Ltd., Japan
Gelkammer Blue Marine	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

Magnetrührer	IKA GmbH&Co.KG, Staufen, D
Mikroskop	Leica, Wetzlar, D
Multipette 4780	Eppendorf, Hamburg, D
pH Meter	Schott Geräte GmbH, Hofheim, D
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, D
Polyacrylamidgel-Elektrophorese-Zubehör	Biorad, Hercules, USA
Rotorgene 200	LTF-Labortechnik GmbH & Co.KG, Wasserburg, D
Schüttler WT 12	Biometra, Göttingen, D
Sequenzier Mega BACE 1000	Amersham Life Science, Freiburg, D
Spektrophotometer Gene Quant	Amersham Life Science, Freiburg, D
Sterilbank	Biohit Antares, Helsinki, Finnland
Stromversorgungsgeräte	Biometra, Göttingen, D
Waagen	Sartorius, Göttingen, D
Wallac Victor2 1420 Multilabel Counter	Wallac, Turku, Finnland
Wasserbad	GFL, Burgwedel, D
Vortex	IKA GmbH&Co.KG, Staufen, D
Western Blot Zubehör	Biorad, Hercules, USA

Zentrifugen:

Eppendorf Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg, D
Eppendorf Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, D
Multifuge 3 S-R	Heraeus, Osterode, D
Sorvall RC 5C Plus	Kendro, Newtown, USA

3.1.5. Software

Rotorgene , Corbett Research, Australien
LAS Reader, FUJI
AIDA, Ray Test
Workout, Wallac, Perkin Elmer
Chromas 2, Technelysium, Melensvale, Australien
Vector NTI, Infor Max, Inc., Oxford, UK

3.2. Methoden

3.2.1. Funktionelle Studien

3.2.1.1. Zellkultur

Die Kultivierung der humanen Monozyten erfolgte in RPMI 1640 Medium (2mM L-Glutamin, 1,5g/l HCO₃, 10mM HEPES) unter Zusatz von 5mM D(+)-Glucose, 2mM Natriumpyruvat, 10% (v/v) FCS, sowie 5mg Levofloxacin (Tavanic®)/500ml Medium in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre bei 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit. Der Wechsel des Mediums wurde 2x wöchentlich durchgeführt, alle 2 Tage, wenn ein Experiment die Dauer von 48h überschritt.

Zur Durchführung der Experimente erfolgte die Primärinkubation mit 100nM PMA über 24h in einem mit fettfreien/gestripptem FCS versetzten Medium. Dadurch wurde die Ausdifferenzierung der Monozyten zu makrophagenartigen Zellen bewirkt. Die in Suspension wachsenden Monozyten wurden auf eine Konzentration von 8×10^5 Zellen/ml Medium eingestellt. In einer 6-Well-Zellkulturtestplatte wurden pro Versuchsansatz 2ml der Zellsuspension eingesetzt.

Alle Experimente wurden im Triplikat durchgeführt und insgesamt 3x wiederholt.

3.2.1.1.1. Herstellen von gestripptem Serum

In diesem Verfahren sollen metabolisch aktive Substanzen, z.B. nichtveresterte Fettsäuren, Wachstumsfaktoren und Hormone, die physiologisch im Serum vorkommen, von diesem abgetrennt werden.

In einem Verhältnis von 20:1 wird FCS mit einer Dextran-Aktivkohle-Suspension gemischt und unter Schütteln 30 min bei 50°C inkubiert. Bei der anschließenden Zentrifugation bei 10.000g und 4°C werden die beladenen Aktivkohlepartikel separiert und verbleiben am Boden der Tubes. Der abgenommene Überstand wurde, sterilfiltriert und aliquotiert, bei –20°C gelagert.

Dextran-Aktivkohle-Suspension:

<i>3,5mM NaCl</i>	<i>5,12mg</i>
<i>0,5%(w/v)Aktivkohle</i>	<i>125mg</i>
<i>0,05% (w/v) Dextran</i>	<i>12,5 mg</i>
	<i>ad 25ml mit Reistwasser</i>
	<i>über Nacht bei 4°C schütteln</i>

3.2.1.1.2. Herstellung der Fettsäuren

Fettsäuren stellen eine physiologische Hauptenergiequelle dar. Um die Energie zur Verfügung zu stellen werden sie aus Triglyzeriden, welche in Adipozyten oder Lipoproteinen gespeichert werden, freigesetzt und dann auf dem Blutweg zu entsprechenden Zielgeweben transportiert. Die meisten der im Blut vorkommenden Fettsäuren sind an Albumin gebunden. Diese Bindung ermöglicht den Transport relativ großer Mengen der sonst unlöslichen Moleküle (76).

3.2.1.1.3. Entfetten von BSA

Teilentfettetes BSA wird in Reinstwasser gelöst (10% w/v). Nachdem der Lösung 5% (w/v) Aktivkohle beigemischt wurden, welche im anschließenden Arbeitsschritt die in Lösung übergetretenen FS binden soll, wird der pH-Wert der Lösung durch tröpfchenweises Zufügen von 1M HCl langsam auf pH 3 abgesenkt. Durch Inkubation unter Rühren bei 4°C sollen eventuell noch bestehende Bindungen aufgebrochen werden. Durch 30 minütiges Zentrifugieren bei 4500g werden die beladenen Aktivkohlepartikel durch Sedimentation aus der Lösung abgetrennt und verbleiben am Boden des Tubes. Um die mitunter sehr kleinen Aktivkohlepartikel möglichst restlos zu entfernen, wird der abgenommene Überstand zunächst grob und dann zunehmend feinporiger filtriert (Porengröße 0,4-0,2 µm). Im Anschluss wird der pH der Lösung mittels NaOH 1 M wieder auf 7,4 angehoben.

Um veränderte Osmolarität der Lösung durch die zuvor zugefügten Ionen auszugleichen, wird das Verfahren der Dialyse angewendet. Eine semipermeable Membran ist nur für Moleküle bis zu einer bestimmten Größe (12-14 kDa) durch freie Diffusion selektiv permeabel. Die treibende Kraft des Stofftransports ist ein Konzentrationsgefälle zwischen den durch die

Membran getrennten Flüssigkeitskompartimenten. In einem vorbereiteten Dialyseschlauch (Spectra/Por® 4 Membrane) wird die Lösung zunächst bei 4°C für 2x1h gegen 0,9% NaCl und im Anschluss für 2x1h gegen Reinstwasser dialysiert. Um das nun fettfreie BSA aus der Lösung zu gewinnen, wird das Dialysat lyophilisiert und bis zur weiteren Verwendung unter Feuchtigkeitsschutz bei 4°C gelagert.

3.2.1.1.4. Auflösung der Fettsäuren (77)

Das entfettete BSA wird 10%ig (w/v) in Krebs-Ringer-HEPES-Puffer gelöst. Diese Lösung dient in allen Experimenten als Kontrollsubstrat, da nur die Effekte der Fettsäuren, und nicht etwa die des BSA, analysiert werden sollen.

Krebs-Ringer-HEPES-Puffer

<i>1mM CaCl₂ x 2H₂O</i>	<i>0,147g</i>
<i>5mM NaHCO₃</i>	<i>0,420g</i>
<i>25mM HEPES (pH 7,4)</i>	<i>6,507g</i>
<i>135mM NaCl</i>	<i>7,889g</i>
<i>3,6mM KCl</i>	<i>0,268g</i>
<i>0,5mM NaH₂PO₄</i>	<i>0,0599g</i>
<i>0,5mM MgSO₄</i>	<i>0,06g</i>
<i>2,8mM D-(+)Glucose</i>	<i>0,505g</i>
	<i>Ad 1l mit dd H₂O, pH 7,4</i>

Durch enzymatische Messung des NEFA-Gehaltes in 20µl der Lösung wird zunächst die völlige Fettfreiheit der BSA-Lösungen überprüft/bestätigt und diese erst dann zur weiteren Verwendung freigegeben.

Als Stocklösungen wurden 10mM Fettsäurelösungen hergestellt. Der BSA-Lösung wurden die pro Volumen entsprechende FS-Menge sowie äquimolar 10mM NaOH zugefügt, um das Ablösen der Fettsäuren zu beschleunigen und das Natriumsalz der Säure zu erhalten. Unter Lichtschutz und N₂-geflutet inkubieren die Lösungen unter leichtem Rühren bei 37°C über Nacht, oder bis die Fettsäuren gelöst und an Albumin gebunden sind.

Durch Zentrifugieren bei 10.000g für 30 Minuten werden die ungelösten Fettsäuren abgetrennt und bilden am Boden des Tubes ein Pellet. Im Überstand kann nun der Gehalt an gelösten, gebundenen Fettsäuren gemessen werden.

Um einer möglichen Oxidation vorzubeugen, werden die Fettsäurelösungen steril aliquotiert und unter Stickstoffatmosphäre bei -20°C gelagert.

3.2.2. Aufbereitung der Proben

3.2.2.1. In vitro Probengewinnung

U-937-Zellen wachsen in Suspension, so dass die Lyse der Zellen ein vorheriges Abzentrifugieren des Kulturmediums nötig macht. Um die Zellen bei diesem Schritt nicht mechanisch zu beschädigen, erfolgte die Zentrifugation auf niedriger Stufe bei 500g für eine Dauer von 4 min. Der Mediumüberstand wurde abgesaugt und die gewünschte Menge Lysereagenz substituiert. Durch Hin- und Herpipettieren mit einer großlumigen Pipette, sowie anschließendes Vortexen auf hoher Stufe für etwa 2x 10 sec. wurde die mechanische Zerkleinerung und somit eine effektive Lyse erreicht.

Bei Experimenten, in denen eine Primärinkubation mit PMA stattgefunden hat, ändern sich durch die mit PMA induzierte Ausdifferenzierung der monozytären Zellen zu makrophagenähnlichen Zellen auch deren Eigenschaften. Durch Haftung der Zellen am Boden der Zellkulturplatte wurde ein sofortiges Absaugen des Mediums möglich. Nach Zugabe der Lysereagenz wurden die Zellen mechanisch mittels Zellschaber gelöst und gleichzeitig lysiert und dann sofort in ein 1,5ml Eppendorf Tube überführt.

Die Proben wurden entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert.

3.2.2.2. In vivo Monozytenpräparation

Nach Genehmigung durch die Ethikkommission der Freien Universität Berlin wurden 8 bzw. 4 gesunden männlichen Probanden im Alter 33,5 J +/- 1,3, BMI 24,4 ± 4,4 kg/m² über eine periphere Venenverweilkanüle 90ml/h der Lipidemulsion Abbolipid 20% unter dem Zusatz von 0,4 IU/kg Körpergewicht Heparin/Calcium zugeführt. Die Experimente wurden nach einer 10 stündigen nächtlichen Nahrungskarenz in einer stressfreien Umgebung unter

Ausschluss physischer Aktivität der Probanden durchgeführt. Die Blutentnahmen erfolgten aus einer weiteren peripheren Vene zum Zeitpunkt 0, 120, 240 sowie 300 Minuten.

Mit Hilfe der Dichtestufengradientenzentrifugation können periphere mononukleäre Zellen (B-/T-Lymphozyten, Monozyten, NK-Zellen) aus Vollblutproben abgetrennt werden. Die spezifische Dichte einer Lösung bewirkt eine Auftrennung der Zellen während der Zentrifugation. Mit 1077g/ml ist die Lösung NycoPrep™ dichter als mononukleäre Zellen, aber leichter als Granulozyten und Erythrozyten und Zelltrümmer. Das führt dazu, dass während der Zentrifugation Erythrozyten und Granulozyten die Lösung durchwandern und sich am Boden des Tubes sammeln. Die mononukleären Zellen verbleiben wegen ihrer geringeren Dichte in der Interphase, welche nun abgenommen und weiterbehandelt werden kann.

Lymphozyten und Monozyten unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Oberflächenantigene. So exprimieren beispielsweise alle T-Lymphozyten das CD 3 Antigen, T-Helferzellen CD 4, T-Suppressorzellen CD 8 und B-Zellen das CD 19 und 79 Antigen. Phänotypisch für Monozyten ist das CD 14 Oberflächenantigen. Dynabeads® M-450 CD 14 sind supermagnetische Polystyrolkugeln (engl. Beads), welche mit einem primären monoklonalen Antikörper gegen CD 14 ummantelt sind. Während der Inkubation mit den Zellen der Interphase bilden sich an der Oberfläche der Magnetpartikel spezifische Antigen-Antikörperkomplexe aus. Durch Einbringen in ein Magnetfeld können abschließend die mit Monozyten beladenen Magnetpartikel separiert werden.

Pro Proband werden 2x20µl der Beads zur Aktivierung in 1ml PBS/BSA gewaschen und nach Entfernen des Überstandes bis zur weiteren Verwendung in 20µl PBS/BSA auf Eis gelagert.

Aus einer peripheren Vene werden pro Proband 30ml Vollblut abgenommen zum Zwecke der Antikoagulation mit 300µl 100mM EDTA versetzt (Endkonzentration 1mM).

Das EDTA-Blut wird nun 1:2 mit 1x PBS verdünnt. In einem 50ml Rundbodenröhrchen werden 20ml der Lösung NycoPrep™ 1.077 mit 30ml des PBS-verdünnten EDTA-Blutes überschichtet. Die Verdünnung des Blutes mit PBS bewirkt eine Phasenstabilisierung zwischen beiden Schichten von <85 auf >95% und wirkt so der Tendenz des Blutes, durch das Medium zu gleiten, entgegen. Die Lösungen werden anschließend bei RT für 15 Minuten bei 800g zentrifugiert. Hierbei findet die oben beschriebene Umverteilung der Zellen statt. Am Boden des Tubes bildet sich ein aus Erythrozyten und Zelltrümmern bestehendes Pellet aus,

welches von dem Medium, der die Monozyten enthaltenden Interphase, sowie oberster Schicht dem Plasma mit Thrombozyten bedeckt wird. Mit einer Pasteurpipette wird die Interphase möglichst ohne Kontakt zu allen anderen Schichten vorsichtig abgenommen und in ein neues Rundbodenröhrchen überführt und 1:2 mit PBS verdünnt. In einer anschließenden 5minütigen Zentrifugation bei 800g werden die Zellen der Interphase am Boden des Tubes gesammelt. Der Überstand wird abgenommen und verworfen. Das Pellet wird in 1ml PBS/BSA resuspendiert und anschließend zu den Magnetbeads gegeben. Bei 4-8°C unter leichter Rotation findet innerhalb von 30 Minuten die Ausbildung der Antigen-Antikörperkomplexe statt.

Um alle nichtgebundenen Zellen aus der Lösung zu entfernen, werden die beladenen Beads abschließend 3x in 1ml PBS/BSA gewaschen. Zum Wechseln der Waschpuffer werden die Beads jeweils in das Magnetfeld eingebracht.

Nach letztmaligem Abpipettieren des Waschpuffers können Lysereagenzien direkt auf die beladenen Dynabeads® gegeben werden. Durch kurzes Anzentrifugieren (*short spin*) werden die Magnetpartikel aus dem Lysat abgetrennt, welches dann gemäß dem entsprechenden Protokoll weiterverarbeitet werden kann.

PBS/BSA

0, 1% (w/v) BSA 0,05g BSA Fraction V Fatty acid free
ad 50ml mit 1xPBS

3.2.3. RNA-Extraktion

Die Extraktion der RNA erfolgte mittels Trizol nach dem modifizierten Protokoll des Herstellers.

Pro ml Trizol wurden 200µl Chloroform hinzugegeben und nach kurzem Vortexen 2 min. bei RT inkubiert. In einer nachfolgenden Zentrifugation bei 12000g und 4°C erfolgte die Auftrennung in eine wässrige und eine organische Phase sowie eine untere rötliche Phenol-Chloroform-Phase. Da sich die RNA ausschließlich in der wässrigen oberen Phase befindet, wurde diese ohne die organische Phase zu berühren abgenommen und in ein neues Tube überführt. Durch Zugabe von Isopropanol erfolgte die Präzipitation der enthaltenen RNA. 500µl Isopropanol/ml Trizol wurden der abgenommenen Phase zugefügt. Nach kurzem

Vortexen, einer 10minütigen Inkubationszeit auf Eis und nachfolgender 15minütiger Zentrifugation bei 12000g und 4°C bildete sich am Boden des Tubes ein Pellet.

Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Pellet wurde in mindestens 1ml 75% Ethanol (in DMPC-Wasser)/ ml Trizol gewaschen. Der Waschriff beinhaltet kurzes Vortexen und Zentrifugation bei 12000g und 4°C über 10 Minuten. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet für ca. 5 Minuten bei RT luftgetrocknet.

In Abhängigkeit von der Pelletgröße wurde die RNA in einem angemessenem Volumen (meist 50µl) DMPC-Wasser gelöst und bei -20°C gelagert.

DMPC-Wasser:

1% DMPC (v/v)	1ml
50% Ethanol (v/v)	99ml
ad 1l H ₂ O	900ml

Dimethylpyrocarbonat (DMPC) wurde in 50% Ethanol gelöst und anschließend im Verhältnis 1:10 mit Reinstwasser gemischt. Die Lösung wurde 30min. bei RT gerührt und anschließend autoklaviert. Durch Behandlung des Wassers mit DMPC werden RNAsen inaktiviert, indem Histidinreste des aktiven Zentrums chemisch modifiziert werden.

Bei der Dampfsterilisation zerfällt DMPC zu Methanol und CO₂.

3.2.3.1. Bestimmung der RNA-Konzentration

Der Gehalt und die Reinheit der gewonnenen RNA wurden spektralphotometrisch ermittelt.

Die RNA wurde mit DMPC-Wasser 1:50 verdünnt. Dieser 100µl-Ansatz wurde bei einer Wellenlänge von 260nm und 280nm gemessen.

Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors wurde die Konzentration in µg/µl anhand der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt.

Durch zusätzliche Messung der Extinktion bei 280nm und Bildung des Quotienten der Extinktionswerte bei 260 und 280nm konnte eine Aussage über die Reinheit der RNA getroffen werden. Bei Werten über 1,8 konnte das Produkt als frei von Proteinkontamination und somit rein betrachtet werden.

3.2.3.2. Reverse Transkription

Mittels des Enzyms Reverse Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, ist eine Umschreibung von mRNA in cDNA (complementary DNA) möglich. DNA-Primer, die sich basenkomplementär an den RNA-Strang lagern bilden den Ansatzpunkt für das Enzym. Die verwendeten dN₆-Primer, zufällig synthetisierte Nucleotid-Hexamere, lagern sich an komplementären Regionen der RNA an und ermöglichen so die Vervielfältigung.

Von der isolierten RNA wurde 1 µg in 8 µl DMPC-Wasser zur vollständigen Denaturierung 5 min. bei 95°C erhitzt und anschließend auf Eis überführt. Pro Ansatz wurden 1xRT-Puffer, 40 U RNAsin, 10mM DTT, 0,5mM dNTP's, 10µM dN₆-Primer und 20U M-MuLV RT als Mastermix zugegeben, so dass das Endvolumen pro Ansatz 20 µl betrug.

Nach Kurzzentrifugation erfolgte die Inkubation im Gradientencycler. In einem ersten, 10 minütigen Schritt bei 18°C wurde die Anlagerung der Primer an die RNA ermöglicht (Annealing). Die nachfolgende Temperaturerhöhung auf 37°C für 1h entspricht dem Temperaturoptimum des in diesem Versuch verwendeten Enzyms, die eigentliche Umschreibung findet statt. In einem abschließenden Schritt wurde das Enzym durch 5minütiges Erhitzen auf 95°C vollständig inaktiviert.

3.2.4. Real - Time - PCR

Mit Hilfe der Polymerase- Kettenreaktion (PCR) ist es möglich, spezifische Sequenzbereiche aus geringsten Ausgangsmengen von Nukleinsäuren schnell zu amplifizieren und so der Analytik und Weiterverarbeitung zugänglich zu machen.

Als Primer bezeichnete Oligodesoxyribonukleotide definieren den zu kopierenden Sequenzabschnitt, indem sie an Orten komplementärere Sequenz mit der Ziel DNA hybridisieren und als Starter für die Polymerisation dienen

In einem ersten Schritt wird das doppelsträngige DNA-Molekül unter Hitzeeinwirkung in Einzelstränge aufgespalten (Denaturierung). Durch Absenken der Temperatur hybridisieren die Primer mit den zu ihnen komplementären DNA-Abschnitten (Annealing). Die entstandenen DNA-Einzelstränge dienen somit als Matrize für die nachfolgende bei 72°C durchgeführte, durch das thermostabile Enzym DNA-Polymerase katalysierte,

Polymerisationsreaktion (Extension). Durch Wiederholung des Temperaturprofils nimmt die Gesamt-Produktmenge exponentiell zu.

Der Prozess der exponentiellen Produktbildung wird jedoch durch verschiedene Faktoren begrenzt. Die Netto-Produktbildung geht im Laufe der Reaktion auf Null zurück, und die Gesamtmenge an PCR-Produkt erreicht einen Plateauwert (78).

Bei dem als Real-time-PCR bezeichnetem Verfahren wird die Menge an entstandenem PCR-Produkt in Echtzeit (*real time*) gemessen. SYBR Green I ist ein fluoreszierender, unsymmetrischer Cyanidfarbstoff, der sequenzspezifisch an ds-DNA bindet. SYBR Green I lässt sich in Gegenwart von Blaulicht anregen und zeigt sein Emissionsmaximum bei einer Wellenlänge von 520nm. An ds-DNA gebundenes SYBR Green I fluoresziert ungefähr 1000mal stärker als die ungebundene Form, weshalb es so gut geeignet ist, die Akkumulation doppelsträngiger PCR-Produkte sichtbar zu machen.

Innerhalb der exponentiellen Phase der PCR sind die Amplifikationseffizienzen näherungsweise konstant, so dass die Menge an gemessenem Fluoreszenzlicht etwa proportional zur Produktmenge ist. Als Berechnungsgrundlage für die Quantifizierung dient die Ermittlung des Fluoreszenzschwellenwertes. Der Zyklus, in dem eine Probe den errechneten Fluoreszenzschwellenwert signifikant überschreitet, wird als Schwellenwertzyklus (*Threshold cycle*) bezeichnet. Je mehr Zielsequenz sich in der zu untersuchenden Probe befindet, desto eher wird dieser Schwellenwert erreicht.

Die Quantifizierung erfolgt durch Vergleich des Schwellenwertzyklus der Probe mit einem parallel amplifizierten Schwellenwertzyklus eines DNA-Standards des gleichen Gens. Der DNA-Standard wird in unterschiedlichen Verdünnungsstufen amplifiziert. Jeder Verdünnungsstufe wird willkürlich eine (logische) Kopienzahl zugeordnet. Beispielsweise entspricht der reinen DNA-Standardprobe eine Kopienzahl von 1000, ihre 1:2 Verdünnung enthält demnach die angenommene Kopienzahl von 500 usw. Aus mindestens drei Verdünnungsstufen in jedem PCR-Lauf wird so eine Korrelationsgerade errechnet. Jeder der gemessenen Proben kann nun ein Punkt auf der Korrelationsgeraden zugeordnet werden und so eine Aussage über den absoluten Ziel- DNA-Gehalt in der Probe gemacht werden.

Die Korrektheit der Aussage setzt den Einsatz immer konstanter *template*- DNA Mengen voraus. Diese kann durch alleinige photometrische Bestimmung der RNA-Konzentrationen nicht gewährleistet werden. Prinzipiell sind weiterhin unterschiedliche Effizienzen der RT-Reaktionen denkbar. Der Ziel- DNA-Gehalt in der jeweiligen Probe muss für ein

Haushaltsgen korrigiert werden. Haushaltsgene sind Gene, die bei Basalfunktionen innerhalb der Zelle eine Rolle spielen. Es wird davon ausgegangen, daß diese unter verschiedensten Bedingungen in immer konstanter Weise exprimiert werden und sich durch Manipulation weder stimulieren noch supprimieren lassen. Als Haushaltsgene in der vorliegenden Arbeit dienten α -Tubulin, sowie β -Actin, beide Bestandteile des Zytoskeletts. Die Aussage über die Expression des Zielgens wird also verfeinert, indem nicht die absolute Menge des Zielgens betrachtet wird, sondern vielmehr das Verhältnis (in %) von Ziel- DNA zu Haushaltsgen-DNA pro Probe.

Die Effizienz der Amplifikation eines bestimmten Genabschnittes hängt im Wesentlichen von den in der Reaktion verwendeten Reagenzien und einem geeigneten Temperaturprofil ab. Die verwendeten Primer sollen am 3'-Ende möglichst keine inter- und intramolekularen komplementären Bereiche besitzen, um die Ausbildung von Primer Dimeren zu verhindern und sich durch hohe Spezifität auf die Zielsequenz auszeichnen. Um eine Amplifikation genomischer DNA zu verhindern, ist die Lage der Primer so zu wählen, dass ein möglichst großes Intron überspannt wird. Daneben ist es nötig verschiedene Pufferkompositionen (v.a. die Konzentration an Oligonukleotidprimern, $MgCl_2$ und Fluoreszenzfarbstoff) und Taq-Polymerasekonzentrationen zu testen, um eine Optimierung der Reaktionsbedingungen zu gewährleisten.

Auch das Temperaturprofil muss an die Gegebenheiten angepasst werden. Die Denaturierung soll ausreichend lange erfolgen, um eine effektive Einzelstrangbildung zu bewirken. Allerdings beeinflussen die Höhe und Dauer der Temperaturerhöhung die Aktivität des Enzyms, so dass dieser Schritt auf ein nötiges Minimum reduziert werden muss. Die Denaturierungstemperatur wird üblicherweise auf $3^\circ C$ über dem Schmelzpunkt des Produktes festgesetzt, ihre Dauer nimmt mit zunehmender Fragmentlänge zu. Maßgeblich für die Effizienz der Reaktion sind auch die primerspezifische Annealingtemperatur und -dauer. Die Annealingbedingungen orientieren sich an den Schmelzpunkten der Primer und müssen exakt gewählt werden. Abweichungen zu höheren Temperaturen resultieren im Unvermögen der Primer, basenkomplementär zu binden, während die falsch niedrigen Temperaturen unspezifische Basenpaarungen begünstigen, was zur Amplifikation eines falschen Fragmentes führen kann. Auch unnötig lange Temperaturhaltezeiten führen unter Umständen zur Anbindung der Primer an Zielsequenzen mit nur teilweiser komplementärer Homologie.

Die Elongationstemperatur richtet sich nach dem Temperaturoptimum des verwendeten Enzyms.

3.2.4.1. uPAR-PCR

Grundlegende Voraussetzung für eine gute Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Reaktionen ist die möglichst identische Zusammensetzung der Reaktionsansätze. Um pipettierbedingte Variationen in den Reagenzienkonzentrationen zu minimieren, wurden bei allen Versuchen die Einzelkomponenten der Reaktion in einem Mastermix zusammenpipettiert und dann in gleichen Volumina pro Probe zugegeben.

Als Mastermix wurde zunächst pro Probe 12,55 μl ddH₂O, 2,5mM MgCl₂, je 0,2 μM upstream- und downstream-Primer, 0,2mM dNTPs und 0,5x SYBR Green I zusammenpipettiert und durch kurzes Vortexen miteinander vermengt. Die Zugabe von 1,25U Taq-Polymerase zum Mastermix erfolgte erst unmittelbar vor der Verwendung. In 100 μl Reagiergefäßen wurden anschließend 2 μl cDNA vorgelegt und mit 18 μl des Mastermixes auf ein Endvolumen von 20 μl eingestellt. Alle Pipettierschritte erfolgten auf Eis.

Die eigentliche PCR-Reaktion erfolgte im Thermalcyclingsystem Rotor-Gene unter definierten Bedingungen. Zunächst wurde die cDNA in einem initialen Schritt für 300s bei 96°C denaturiert. Für die Denaturierung in allen nachfolgenden Zyklen waren Inkubationszeiten von 20s ausreichend. Die Anlagerung der Primer erfolgte bei einer Temperatur von 56°C für 40s. Durch anschließende Erhöhung der Temperatur auf 72°C für 40s fand die Verlängerung der komplementär zum Matrizenstrang angelagerten Primer durch die Taq-Polymerase statt.

Das Temperaturprofil wurde insgesamt 45x durchlaufen.

3.2.4.2. Tubulin-PCR

Die Tubulin-Amplifikation wurde in einem 20 μl -Ansatz bestehend aus folgenden Komponenten durchgeführt: 2,5mM MgCl₂, 0,25 μM upstream- und downstream Primer, 0,25mM dNTP's, 0,5x SYBR Green I, 1,25U Taq-Polymerase, 13,25 μl ddH₂O, 1 μl cDNA.

Die Tubulin-PCR wurde unter den gleichen Temperaturbedingungen durchgeführt.

3.2.4.3. One-step RT-PCR

Die Entwicklung neuer Techniken ermöglicht die Durchführung der reversen Transkription und der PCR Reaktion in einem Schritt (*one-step*).

Die für beide Reaktionen benötigten Reagenzien werden zu Beginn des Versuches gemeinsam in ein Tube gegeben. Dies setzt jedoch die Modifizierung der verwendeten Enzyme voraus.

Im verwendeten QIAGEN QuantiTect SYBRGreen RT-PCR Kit sind derartig modifizierte Enzyme mit allen weiteren Substraten in optimalem Verhältnis zusammengestellt. Das Kit besteht aus verschiedenen Teilkomponenten. Der RT Mix enthält eine Mischung aus Omniscript® und Sensiscript® Reverse Transkriptase. Diese Mischung beider Enzyme gewährleistet die Transkription sowohl sehr kleiner (Sensiscript®), als auch größerer RNA Mengen (Omniscript®). Als Enzym für die anschließende PCR ist im RT-PCR Mastermix die HotStartTaq® DNA-Polymerase enthalten, die sich dadurch auszeichnet, dass sie bis zu einer gewissen Temperatur keine enzymatische Aktivität aufweist. Das Enzym wird erst durch einen 15-minütigen Inkubationsschritt bei 94°C aktiviert, im gleichen Schritt werden die Enzyme der RT inaktiviert. Somit wird gewährleistet, dass beide Reaktionen unabhängig voneinander im selben Reaktionstube ablaufen können.

Pro Reaktionsansatz wurden 4µl Mastermix aus folgenden Komponenten zusammengestellt: 1xQuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix, 0,45µM upstream- und downstream Primer, 0,05µl QuantiTect RT-Mix und 1µl RNase freies Wasser. Als Template wurden 10ng RNA eingesetzt, welche zuvor auf eine Konzentration von 10ng/µl verdünnt wurde, so dass das gesamte Reaktionsvolumen 5µl betrug. Alle Pipettierschritte wurden auf Eis durchgeführt.

Die Amplifikation erfolgte im Sequence Detection System ABI PRISM 7900 HT unter definierten Bedingungen. Zunächst wurde die Temperatur für 30 Minuten auf 50°C gehalten. Während dieses Schrittes erfolgte die Umschreibung der RNA auf cDNA. Anschließend wurde die Temperatur für 15 min. auf 94°C erhöht, um wie bereits erwähnt das Enzym der PCR zu aktivieren und gleichzeitig die Enzyme der RT zu inaktivieren. Die nachfolgenden Temperaturzyklen entsprechen denen einer normalen PCR-Reaktion. 15sec. Denaturierung bei 94°C, Annealing und Extension in einem Schritt für 1 min. bei 60°C, 40 x Durchlaufen des Zyklus.

Gen	Vorwärts Primer	Rückwärts Primer
ACACA2	AGAATCCCAAACCTACCGGAAGCTT	GCCACTATGGAAGATGCAATCTT
CPT1 α	TCAATTTCCACATTTCTTCCAAGTT	GTGCCTTCCAAAGCGATGAG
HDAHB	GGAAAGAAGGAGGCCAGTATGG	TTCTTCTGGATCTATTATTTGGATAAGC
PGC1	GGGAAAGTGAGCGATTAGTTGAG	CATGTAGAATTGGCAGGTGGAA
PPAR α	CTTCAACATGAACAAGGTCAAAGC	AGCCATACACAGTGTCTCCATATCA
PPAR γ	TTGTAGCAGGTTGTCTTGAATGTCT	GGGAAAGTGAGCGATTAGTTGAG
uPAR	CTGGAGCTGGTGGAGAAAAG	TAACGGCTTCGGGAATAGG
α -Tubulin	ACCTGTCACCCCGACTCAAC	GGTCTTGTCACCTGGGCATCT
β -Actin	GCCAACCGCGAGAAGATG	CCAGAGGCGTACAGGGATAG

Abb. 3.1.:Sequenzen der verwendeten Primer

3.2.4.4. Kontrolle der PCR

Zur Beurteilung der Effizienz der PCR-Reaktion stehen vielfältige Möglichkeiten zur Verfügung. Besonders eindrücklich ist die im Anschluss an jede Amplifikation durchgeführte Schmelzkurvenanalyse. Jedes PCR Produkt zeichnet sich durch einen spezifischen Schmelzpunkt aus. Dieser liegt für uPAR bei 93,6°C und für Tubulin bei 94,1°C.

Die Schmelzkurve sollte nach jeder Reaktion also nur einen Peak bei der jeweiligen Temperatur aufweisen. Nur Amplifikationen, die dieses Kriterium erfüllten wurden zur Analyse herangezogen. Sind mehrere Peaks vorhanden, ist von der Entstehung unspezifischer Nebenprodukte auszugehen, die dann ihrerseits durch Verschiebung des Schwellenwertzyklus falsch hohe cDNA-Konzentrationen vortäuschen. Diese Nebenprodukte sind größtenteils Primer-Dimere, die unter anderem daran zu erkennen sind, dass der Schmelzpunkt zu Gunsten niedriger Temperaturen verschoben wird. Findet sich nur ein Peak bei einer deutlich niedrigeren Temperatur als dem erwarteten Schmelzpunkt des PCR-Produktes, hat keine spezifische Amplifikation stattgefunden.

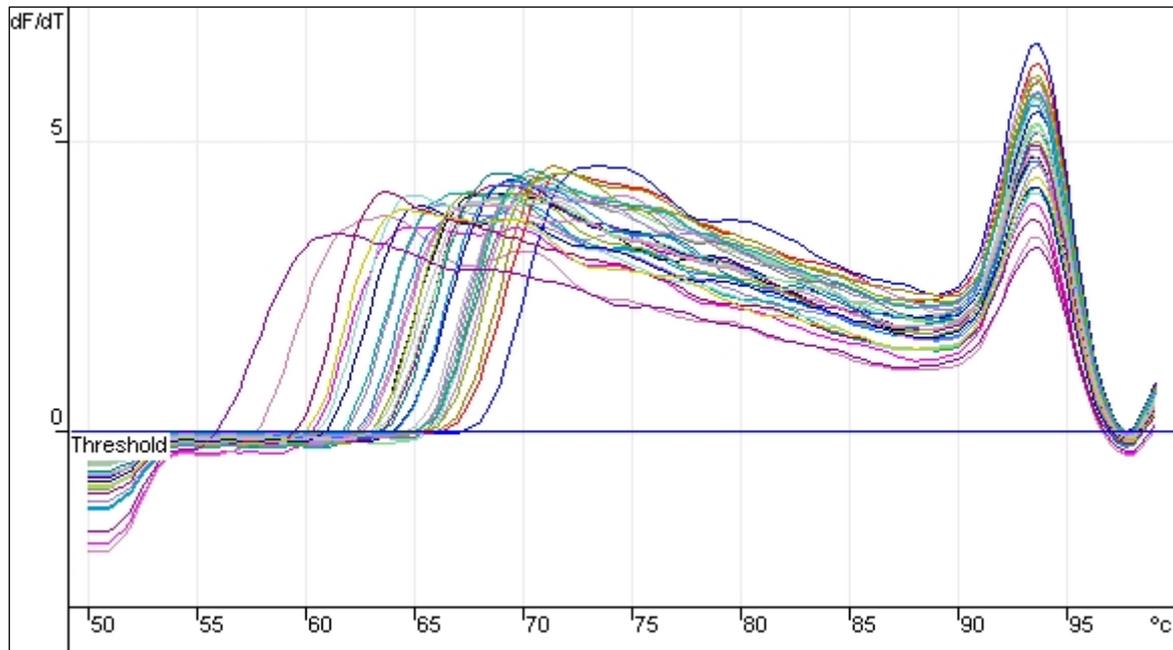


Abb. 3.2.: Dargestellt ist die typische Schmelzkurve für uPAR. Der spezifische Schmelzpunkt liegt bei 93,6 $^{\circ}C$

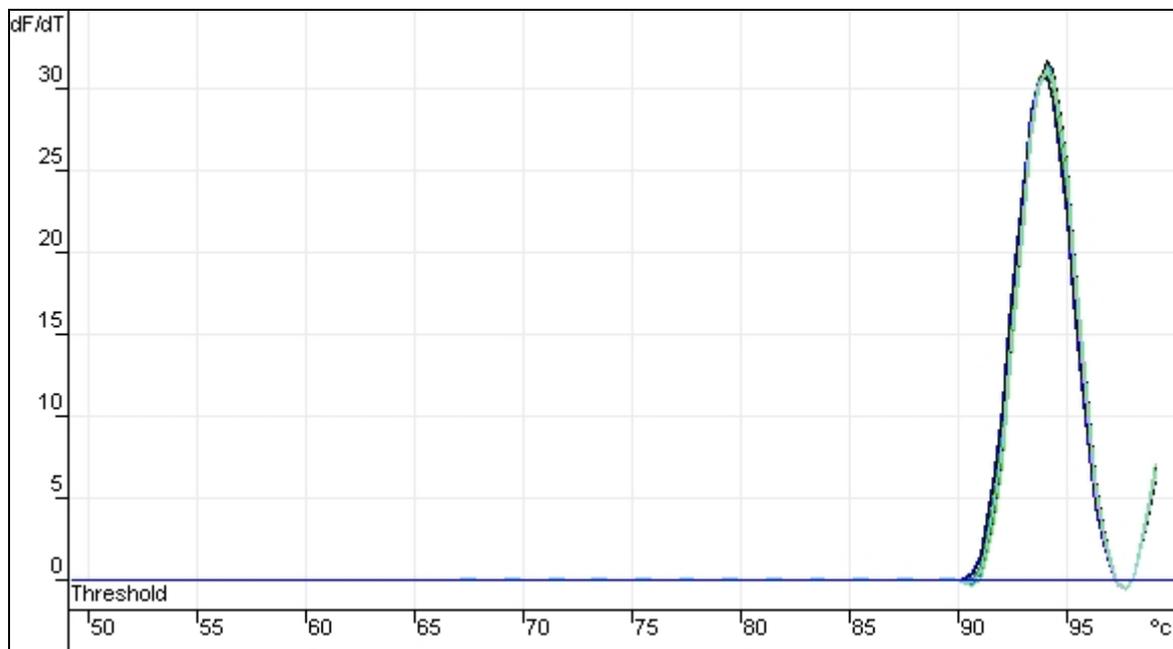


Abb. 3.3.: Tubulin-Schmelzkurve mit ihrem charakteristischen Peak bei 94,1 $^{\circ}C$.

Die PCR-Effizienz kann des weiteren über die Standardkurve beurteilt werden. Eine Verdünnungsreihe wird in Triplikaten analysiert, um so die Amplifikationsrate bei unterschiedlichen Zielstrangkonzentrationen zu vergleichen. Eine optimale Effizienz ergibt sich, wenn die Anzahl der PCR-Produkte in jedem Zyklus verdoppelt wird. Anders ausgedrückt erwartet man zwischen einem unverdünnten cDNA-Standard und ihrer 1:2 Verdünnung den Abstand von exakt einem Schwellenwertzyklus. Analog dazu liegen zwischen der 1:2 Verdünnung und 1:5 Verdünnung 1,3 Zyklen, zwischen der unverdünnten Probe und der 1:5 Verdünnung 2,3 Zyklen. Schwankungen von $\pm 0,4$ Zyklen wurden toleriert, bei größeren Abweichungen wurde der gesamte Lauf wiederholt.

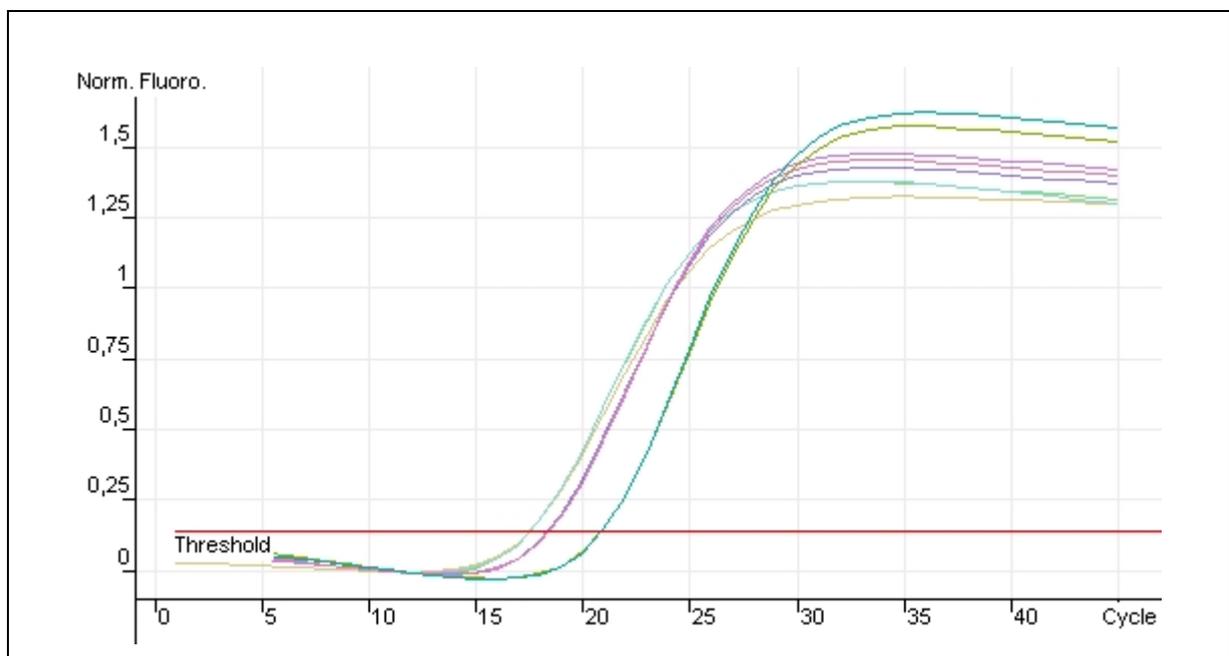


Abb. 3.4.: Verdünnungsreihe uPAR: unverdünnt, 1:2 und 1:10-Verdünnung jeweils im Triplikate

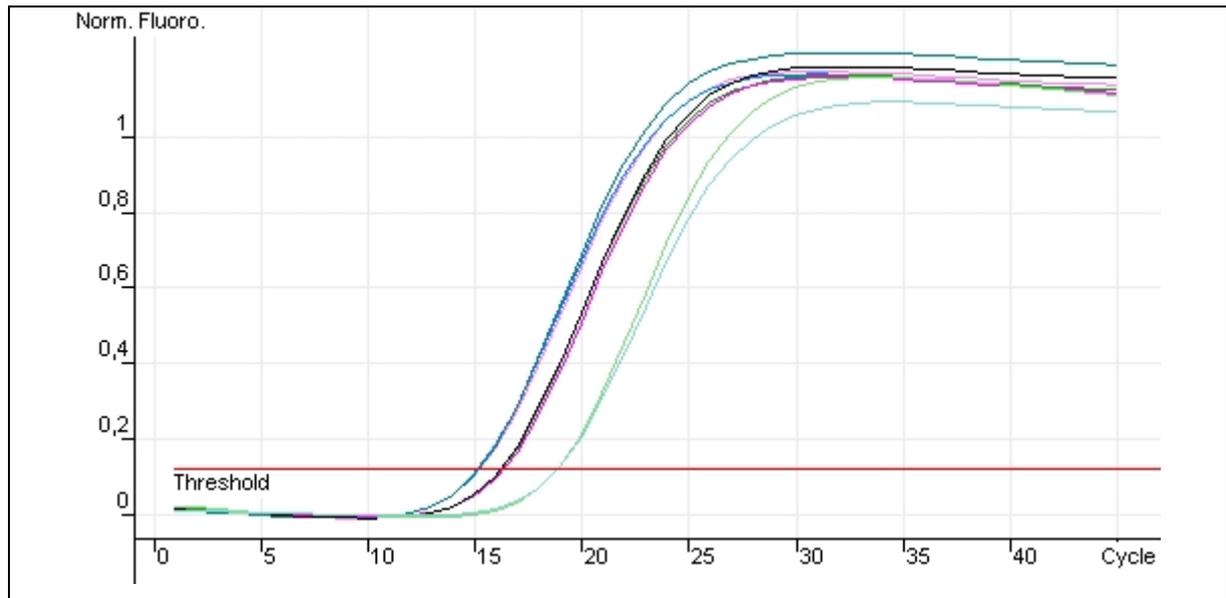


Abb. 3.5.: Verdünnungsreihe Tubulin: unverdünnt, 1:2, 1:10 Verdünnung jeweils als Triplikat

3.2.4.4.1. Agarosegelelektrophorese

Um PCR-Produkte sichtbar zu machen, eignet sich die Methode der Agarose-Gel-elektrophorese. Negativ geladene DNA-Partikel bewegen sich in einem elektrischen Gleichstromfeld horizontal durch eine Agarosegelmatrix und wandern in Abhängigkeit von ihrer Größe unterschiedlich weit in Richtung Anode. Agarose ist ein lineares Polysaccharid aus roten Meeresalgen, in dem D-Galactose und 3,6- Anhydro-L-Galactose abwechselnd in glykosidischer Bindung miteinander verknüpft sind. Unter Erhitzen ist sie in Wasser gut löslich. Während des Abkühlens bilden sich doppelhelikale Strukturen aus, die sich so zusammenlagern, dass ein dreidimensionales Netzwerk entsteht. Die Porengröße des Netzes ist über den Gehalt an Agarose im Gel regulierbar. Üblich sind Agarosekonzentrationen zwischen 1 und 4 % (w/v). Je nach Fragestellung ist also eine geeignete Konzentration zu wählen. In der vorliegenden Arbeit wurden zur Darstellung des uPAR und α -Tubulin-Amplifikates einprozentige Gele verwendet.

Um die DNA-Fragmente sichtbar zu machen wurde dem Gel Ethidiumbromid zugefügt. Ethidiumbromid fungiert als Farbstoff, da es mit der DNA interkaliert und im ultravioletten Licht fluoresziert. Ethidiumbromid bindet sequenzunspezifisch an ds-DNA, so dass sich auch eventuell entstandene Nebenprodukte optisch darstellen lassen. Um einen Anhaltspunkt für die tatsächliche Größe der so dargestellten Nukleinsäurefragmente zu erhalten werden industriell hergestellte Nukleinsäuregrößenstandards (DNA-Leiter) benutzt. Diese zeichnen

sich durch eine definierte Zusammensetzung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größen aus, welche dann als Markerbanden im Gel sichtbar werden.

10 µl des PCR-Ansatzes werden mit 2 µl eines 6x konzentrierten Laufpuffers versetzt.

Der Nukleinsäuregrößenstandard (1kb) wird nach Angabe des Herstellers vorbereitet.

Zur Herstellung des Gels wird die gewünschte Menge an Agarose eingewogen und unter Aufkochen in 1xTAE-Puffer gelöst. Nachdem die Lösung auf etwa 60°C abgekühlt ist, wird Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 µg/ml zugefügt und durch leichtes Schwenken des Gefäßes in der Lösung verteilt.

Die Agaroselösung wird anschließend in eine Gelgießkammer gefüllt. In das noch flüssige Gel eingebrachte Plastikkämme bilden im Gel Aussparungen, die nach dem Erkalten als Geltaschen imponieren, in welche die Proben gefüllt werden.

Nach Aushärten des Gels wird dieses in eine mit 1xTAE-Puffer befüllte Laufkammer gelegt, und die Plastikkämme werden entfernt. Die Geltaschen werden mit Proben sowie dem Größenstandard beladen. Das Volumen an benötigtem Größenstandard richtet sich nach der Größe der Geltasche sowie der Dicke des Gels und bewegt sich in Dimensionen von 1-5 µl.

Die Auftrennung erfolgte im Anschluss durch Anlegen einer elektrischen Spannung, in Abhängigkeit von der Gelgröße zwischen 80 und 130V. Nach 30-45 Minuten waren die Nukleinsäurefragmente aufgetrennt. Durch UV-Belichtung wurden die Fragmente als Banden optisch wahrnehmbar.

TAE-Puffer (50x)

2M Tris Acetat

242g Tris-Base

57,1 ml Eisessig

0,05 M EDTA, pH 8,0

100ml 0,5M EDTA

Ad 1l mit ddH₂O

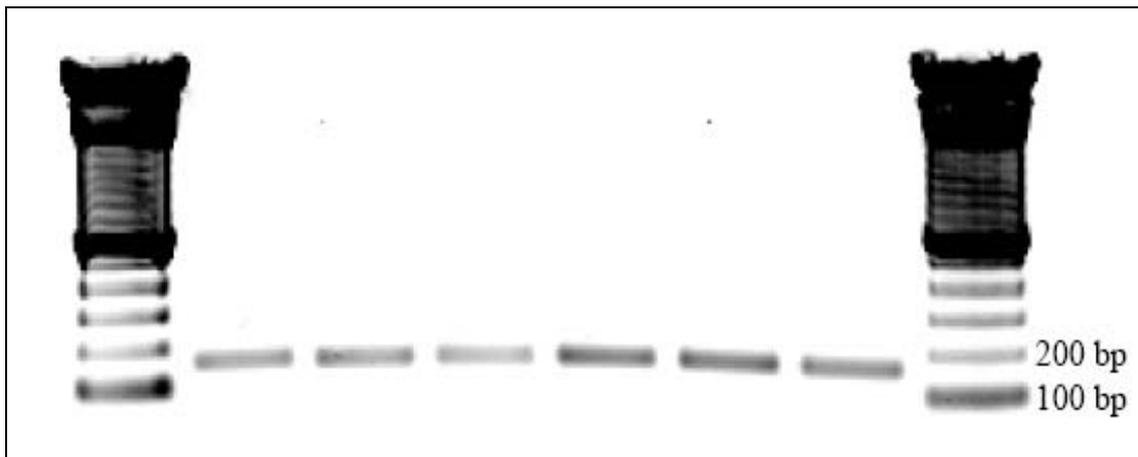


Abb. 3.6.: Dargestellt ist das typische 164bp große uPAR-cDNA Fragment, aufgetrennt in einer 1%igen Agarosegelmatrix, gefärbt mit Ethidiumbromid

3.2.5. Proteinextraktion

Zur Isolation der Proteine wurden die ausdifferenzierten U-937-Zellen mit 2x125µl Lysepuffer versetzt. Die chemische Lyse der Zellen wurde durch mechanische Zellzerkleinerung unterstützt. Zum Schutz der Proteine erfolgten alle Schritte der Proteinextraktion auf Eis. Um die bei der Lyse freiwerdenden Proteasen zu inaktivieren wurden dem Lysepuffer frisch die Proteaseinhibitoren Aprotinin und PMSF (in DMSO) zugefügt. Beide gehören zur Klasse der Serinproteaseinhibitoren und ergänzen sich gegenseitig in ihrem Wirkungsspektrum.

Lysepuffer

0,5% (v/v) Triton X-100 in 1xPBS, 0,1% (v/v) β-Mercaptoethanol

Proteaseinhibitoren

Aprotinin *1:1000*

PMSF *1mM*

3.2.5.1. Proteinbestimmung nach Stoscheck (79)

Der Methode nach Bradford liegt eine Farbveränderung des Farbstoffes Coomassie Brillant-Blau als Folge der Eiweißbindung zugrunde (80). Bei Bindung des Triarylmethanfarbstoffes verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 auf 595 nm und ist durch eine Farbverschiebung von rotbraun nach blau sichtbar. Allerdings ist diese Methode abhängig von der Proteinzusammensetzung im Lysat. Der Farbstoff bindet vor allem an basische Aminosäuren (Arginyl- und Lysylreste) sowie aromatische Aminosäuren. So ergeben sich bei der Messung unterschiedlicher Proteinlösungen je nach deren Zusammensetzung vergleichsweise (falsch niedrige) Extinktionswerte. Durch die Zugabe von NaOH zur Coomassie Brillant Blue Reagenz und einer damit verbundenen Anhebung des pH-Wertes der Reagenzlösung werden Protein zu Protein-Unterschiede minimiert und die Sensitivität des Assays erhöht.

Die Messung des Proteingehaltes jeder Probe wird in Vierfach-Bestimmung durchgeführt. Aus den Messergebnissen wurden im Anschluss Mittelwerte gebildet, die als Grundlage zur weiteren Berechnung dienen.

In einer 96-Well-Mikrotiterplatte wird je 1 µl der Proteinlösung mit 250µl der Coomassie Brillant Blue Reaktionslösung versetzt. Nach 5 bis maximal 30-minütiger Inkubation bei RT erfolgt die Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 595nm. Alle Messergebnisse werden auf eine Standardkurve bezogen. Diese wird aus der Extinktion einer unterschiedlich konzentrierten (0,5µg/µl, 1µg/µl, 2µg/µl, 3µg/µl, 4µg/µl) BSA-Lösung ermittelt. Die Messung wurde nur bei über 98,5%iger Korrelation mit der Standardkurve akzeptiert. Da verschiedene Chemikalien (Triton X-100, 2-Mercaptoethanol u.a.) mit der Reagenz interferieren, wurde in einer weiteren Messreihe pro Mikrotiterplatte 1µl des nativen Lysepuffers mit der Messreagenz versetzt und als Leerwert behandelt, d.h. von den Messwerten der Proteinproben subtrahiert.

Coomassie Brilliant-Blue (= Serva Blue G) Reagenz

<i>10% (v/v) H₃PO₄ (85%ig)</i>	<i>100ml</i>
<i>4,75% (v/v) EtOH (absolut)</i>	<i>47,5ml</i>
<i>0,1mg/ml Serva-Blue G</i>	<i>100mg</i>
	<i>ad 1l mit Reinstwasser</i>

frisch dazugeben: 7µl NaOH (10M)/ml

Proteinstandards:

Für die Stocklösung werden 4g BSA in 1 ml Reinstwasser aufgelöst. Alle anderen Konzentrationsstufen werden durch Verdünnen der Stocklösung hergestellt.

3.2.5.2. Vorbereitung der Proteinproben:

15µg Gesamtprotein wurden mit 1xProteinprobenpuffer versetzt und auf ein Gesamtvolumen von 25µl mit Reinstwasser aufgefüllt.

Um eine Aussage über die Quantität des Proteins in jeder Probe treffen zu können, wurde pro Gel eine Standardreihe aus rekombinant hergestelltem humanem uPAR-Protein angefertigt. Dazu wurden 31, 62 und 125ng des Proteins ebenfalls mit 1xProteinprobenpuffer versetzt und auf das gleiche Gesamtvolumen aufgefüllt. Vor dem Auftragen auf das vorbereitete Polyacrylamidgel wurden die Proben für 5 min. bei 95°C denaturiert.

Proteinprobenpuffer 4x:

<i>0,2M Tris-HCL</i>	<i>2ml 1M Tris-HCl (pH 6,8)</i>
<i>0,4M DTT</i>	<i>617mg</i>
<i>8% SDS (w/v)</i>	<i>800mg</i>
<i>0,04% Pyronin Y (w/v)</i>	<i>4mg</i>
<i>40% Glycerin (v/v)</i>	<i>4,65ml (86%ig)</i>
	<i>ad 10ml mit Reinstwasser</i>

3.2.5.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

In der Gel-Elektrophorese werden komplexe Proteinverbindungen gemäß ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet an die durch Hitzebehandlung denaturierten und in ihre Untereinheiten zerfallenen Proteine. SDS überdeckt die Eigenladung der Proteine so effektiv, dass Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen. Die Zahl der angelagerten SDS-Moleküle ist proportional zum Molekulargewicht der Polypeptide.

Bei der Probenvorbereitung werden die Proben mit einem Überschuss an SDS erhitzt und so die Tertiär- und Sekundärstrukturen durch Aufspaltung der Wasserstoffbrücken und durch Streckung der Moleküle aufgelöst. Durch Zugabe von reduzierenden Thiolverbindungen (DTT) werden Disulfidbrücken zwischen Cysteinen gespalten (Auflösung der Quartärstruktur). Somit wird gewährleistet, dass ausschließlich die molare Masse als Trennkriterium wirkt.

Die Elektrophorese erfolgt in einem von Laemmli eingeführten diskontinuierlichen Tris-HCL/Tris Glycin-Puffersystem.

Als Trägermatrix wird standardmäßig Polyacrylamid verwendet. Je nach Konzentration von Acrylamid im Gel lassen sich unterschiedlich große Proteine auftrennen.

Zwischen zwei in einer entsprechenden Halterung befindlichen, abgedichteten Glasplatten wird zunächst als feinporiges Trenngel ein 8%iges Polyacrylamidgel mit folgenden Inhaltsstoffen gegossen: ddH₂O 6,945ml, Lower Tris 3,75ml, Acrylamid-Stammlösung (30%) 4,005ml, SDS 10% 150µl, APS 10% 15 µl, TEMED 15µl. Bis zur vollständigen Polymerisation wird das Gel mit wassergesättigtem Butanol überschichtet.

Nach Entfernung des Butanols wird das Trenngel mit einem 5%igen Sammelgel überschichtet, in welches Plastikämme mit einer Dicke von 1,5mm eingebracht werden. Durch diese Ämme werden Geltaschen mit einem maximalen Fassungsvermögen von ca. 40µl geschaffen, die später zum Beladen des Gels mit den Proteinproben dienen. Im Sammelgel erfolgt eine Vortrennung und Aufkonzentrierung der einzelnen Proteinklassen.

Zur Herstellung werden 4,17ml ddH₂O, 1,875ml Upper Tris, 1,305ml Acrylamidstammlösung 30%, 75µl SDS 10%, 75µl APS 10% und 7,5µl TEMED vermengt.

3.2.5.4. Semitrockener Proteintransfer

Um die in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennten Proteine für die nachfolgende Antikörperbehandlung zugänglich zu machen, müssen sie zunächst auf eine geeignete Matrix überführt werden. Die verwendeten Membranen müssen eine hohe Bindekapazität für Proteine besitzen. Die hier verwendeten PVDF-Membranen sind hinsichtlich ihrer Binfähigkeit und chemischen Stabilität optimiert.

Der Transfer erfolgt auf elektrophoretischem Weg. Ein elektrisches Feld wird senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung angelegt, wodurch die Proteine auf die Membran gelangen und dort gebunden werden. Beim semi dry (*engl.: halbtrocken*) Blot werden Gel und Membran sandwichartig aufeinander gelegt. Umrahmende Filterpapiere zwischen den Elektroden (Graphitplatten) dienen als Ionen-Reservoir. Methanol im Puffer dient dazu, das SDS aus dem Protein-Detergenz-Komplexen zu entfernen und so die Bindung SDS-freier Proteinkomplexe an die Membran zu erhöhen.

Zunächst wird eine der Trenngelgröße entsprechende PVDF-Membran zur Aktivierung für 5 sec. in Methanol getaucht und anschließend bewässert. Fünf mit Kathodenpuffer getränkte Whatman Filterpapiere werden auf eine Graphitplatte (Kathodenplatte) gelegt. Anschließend wird ein trockenes Filterpapier auf die Rückseite des Polyacrylamid-Gels, von welchem zuvor das Sammelgel abgetrennt wurde, gelegt und das Gel vorsichtig mit einem Metallspatel auf das trockene Filterpapier übertragen. Gel und das trockene Filterpapier werden nun gemeinsam in Kathodenpuffer getaucht und auf die übrigen Papiere aufgelegt. Die PVDF-Membran wird aus dem Wasserbad entnommen und für wenige Sekunden in Anodenpuffer 2 getaucht. Die Membran wird nun exakt auf das Polyacrylamidgel aufgelegt.

Nach Überschichtung mit vier in Anodenpuffer 2 und zwei in Anodenpuffer 1 getränkten Filterpapieren wird die Anoden-Graphitplatte aufgelegt.

Die Übertragung (*engl. Blotting*) der Proteine erfolgt bei 100mA und 20V über 50 min. Die Effizienz der Übertragung konnte durch den Übertritt des im Proteinprobenpuffers enthaltenen Farbstoffes Pyronin Y vom Gel auf die Membran optisch kontrolliert werden.

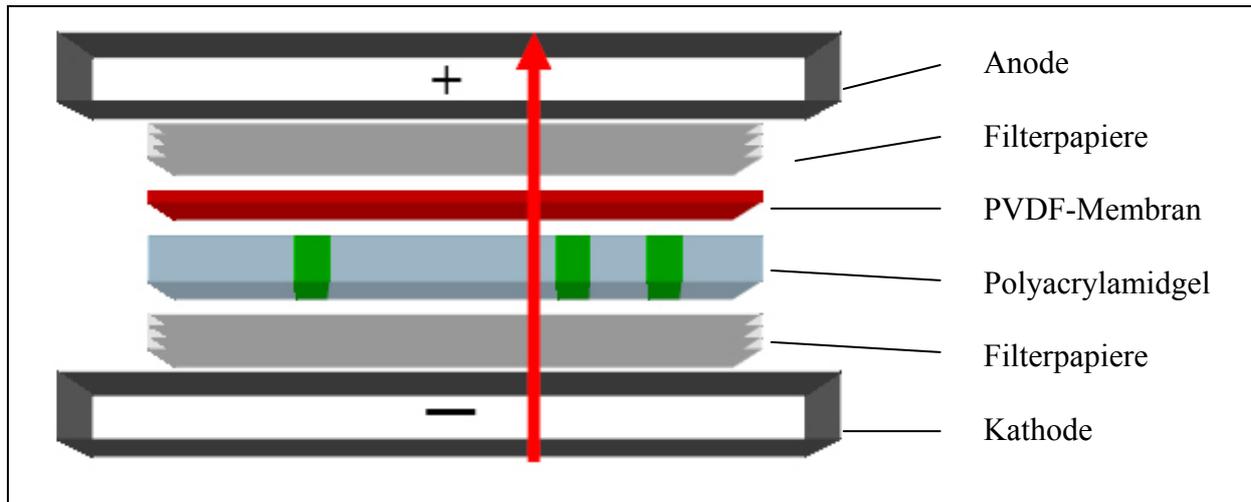


Abb. 3.7: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus beim semi dry blotting

Anodenpuffer 1

<i>0,3M Tris Base</i>	<i>18,17g</i>
<i>20% (v/v) Methanol</i>	<i>100ml</i>
	<i>ad 500ml mit Reinstwasser</i>

Anodenpuffer 2

<i>0,025M Tris Base</i>	<i>1,51g</i>
<i>20% (v/v) Methanol</i>	<i>100ml</i>
	<i>ad 500ml mit Reinstwasser</i>

Kathodenpuffer

<i>0,1M L-Arginin</i>	<i>8,71g</i>
<i>0,01% (w/v) SDS</i>	<i>50mg</i>
	<i>ad 500ml mit Reinstwasser</i>

3.2.5.5. Immunoblot-Analyse

Die Analyse der auf die PVDF-Membran geblotteten Proteine basiert auf dem Prinzip der Antigen-Antikörperreaktion. Um die Reaktion sichtbar zu machen, muss an einem der Reaktionspartner ein Marker vorhanden sein.

Um die unspezifischen Reaktionen möglichst gering zu halten, werden alle unspezifischen Bindungsstellen der Membran zunächst blockiert. Als Blockierlösung wird 5%iges (w/v) Milchpulver in TBS/T verwendet. Jede Membran wird in 25 ml dieser Lösung für 30 Minuten bei RT inkubiert, und anschließend 3x in TBS/T gespült. Als Erstantikörper wird in Ziegen produziertes huPAR spezifisches IgG in einer Konzentration von 0,2µg/ml in TBS/T eingesetzt. Die spezifische Antikörperbindung erfolgt während einer 1 stündigen Inkubation bei RT. Zur Entfernung von noch ungebundenem Antikörper wird die Membran anschließend 3x in TBS/T gespült und für 2x10 und 3x5 Minuten in TBS/T gewaschen.

Der Fc-Teil des Erstantikörpers fungiert nun als Antigen für den mit HRP-gekoppelten Zweitantikörper. Die Membran wird für eine weitere Stunde mit dem 1:5000 in TBS/T verdünnten Anti-Ziegen-Antikörper bei RT inkubiert und wie nach der Erstantikörperbehandlung gespült und gewaschen.

Die optische Darstellung der Reaktion erfolgte mit dem Phototype® HRP Western Blot Detection System. Durch Behandlung mit LumiGLO™ Chelilumineszent Substrat wird in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid die Konversion von Luminol in ein Dianion durch die HRP katalysiert, welches dann Licht emittiert.

Die 20x konzentrierten Substrate werden im Verhältnis 1:1 mit Reinstwasser auf 1x Konzentration verdünnt. Jede Membran wird in 10ml der fertigen Entwicklerlösung für 1 Minute bei RT inkubiert. Anschließend wird überschüssige Entwicklerlösung vorsichtig mit einem Küchenkrepp abgenommen, und die Membranen werden zum Schutz vor Austrocknung in Plastikfolie verpackt.

Die bei der Reaktion freiwerdenden Lichtquanten können im Gerät Fuji LAS Image Reader sichtbar gemacht werden.

Waschpuffer TBS/T 10x:

<i>0,1M Tris Base</i>	<i>12,1g</i>
<i>1,5M NaCl</i>	<i>87,6g</i>
	<i>ad 995ml mit Reinstwasser</i>
	<i>pH 8,0</i>
<i>0,5% (v/v) Tween 20</i>	<i>5ml</i>

Entwicklerlösung

<i>LumiGLIO™ Reagent 20x</i>	<i>0,5ml</i>
<i>Peroxide 20x</i>	<i>0,5ml</i>
	<i>Ad 10ml mit ddH₂O</i>

3.2.5.6. Analyse der Signalintensitäten

Mittels des Analysesystems AIDA (Laserdensitometer) erfolgt die weiterführende Analyse. Zunächst werden den 3 unterschiedlichen Lichtintensitäten in einer Fläche über den spezifischen Banden der Standardreihe Proteinkonzentrationen zugeordnet. Als Hintergrund wird ein Messwert einer gleich großen Fläche außerhalb der spezifischen Banden subtrahiert. Anhand dieser Werte wird eine Standardgerade erstellt. Jeder Probe kann nun ein Punkt auf der Standardgerade zugeordnet werden, der dann den spezifischen Proteingehalt der Probe widerspiegelt.

Zu vergleichende uPAR Signale wurden im Bezug zu einem Vergleichswert auf derselben Membran in Prozent ausgedrückt.

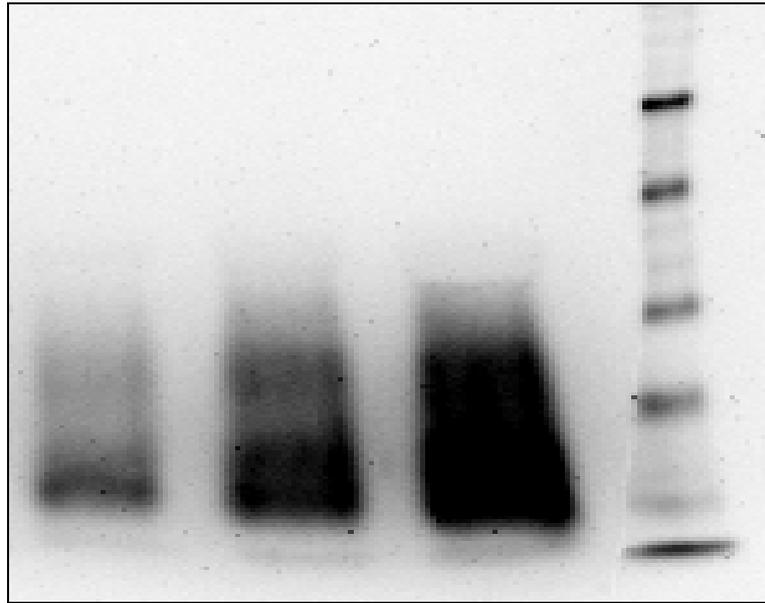


Abb. 3.8.: Dargestellt ist die rhuPAR-Proteinstandardreihe. Von links nach rechts wurden 31 ng, 62 ng bzw. 125 ng Protein aufgetragen. Rechts abgebildet ist der Proteingrößenstandard.

3.2.6.6. Kontrolle des Western Blot

Die Größe des detektierten Proteins kann anhand des dargestellten Proteingrößenstandards abgeschätzt werden. Prinzipiell ist jedoch denkbar, dass es sich trotz gleicher Proteingröße um ein unspezifisches Nebenprodukt handelt, welches nur durch Kreuzreaktion mit dem spezifischen Antikörper dargestellt wurde.

Oftmals taucht weiterhin das Problem auf, dass trotz Spezifität des Antikörpers mehr als eine Bande dargestellt wird. Um zu überprüfen, inwieweit der Antikörper spezifisch an sein Antigen bindet und welche der Banden durch spezifische Antikörperbindung entstanden ist, nutzt man die Methode der Antikörperspezifischen Antigenblockade.

Ein kleines Volumen an Primärantikörper wird zunächst mit einem Überschuss an industriell hergestelltem, spezifischem (uPAR) Peptid inkubiert. Dabei ist darauf zu achten, dass das Peptid im Überschuss zugegeben wird, um alle Bindungsstellen des Antikörpers zu besetzen. Antigen und Antikörper werden im Verhältnis 10:1 (100 µl Antigen, 10 µl Antikörper) gemischt für 2 h bei 37°C und anschließend für 2 h bei 4°C inkubiert. Der Kompetitionsansatz wird in TBS/T verdünnt und auf ein Volumen von 10 ml eingestellt. Anstelle der Primärantikörperbehandlung wird die Kompetitionslösung verwendet. Die weitere Behandlung der Membran erfolgt gemäß dem üblichen Protokoll.

Durch Absättigung der Bindungsstellen des Primärantikörpers sollten sich theoretisch keine Banden mehr darstellen lassen. Sind dennoch Banden darstellbar, ist von unspezifischen Kreuzreaktionen auszugehen, die nicht in die Analytik einbezogen werden.

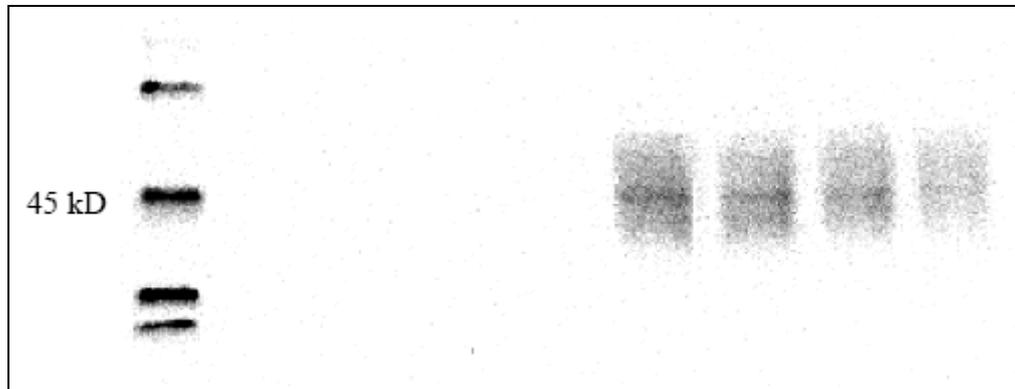


Abb. 3.9.: **Kompetition der spezifischen uPAR-Signale.** Von links nach rechts wurden 50 ng rhuPAR 8-fach aufgetragen, die ersten 4 Reihen sind kompetiert. Links außen ist der ECL-Proteingrößenstandard mit seiner Markerbande bei 45 kDa dargestellt.

3.2.7. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit den Software-Programmen Sigma Plot sowie SPSS 11.5. Zunächst wurde ein Test auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Z-Test) der Daten durchgeführt. Waren die Daten normalverteilt, erfolgte die Ermittlung der Signifikanz mittels parametrischen T-Test. Waren die Daten waren nicht normalverteilt, wurde der p-Wert mit dem Mann-Whintney-U-Test berechnet. Als Signifikanzniveau wurde ein Alphafehler von 5% festgelegt. Alle in dieser Arbeit angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM).

4. ERGEBNISSE

4.1. Freie Fettsäuren steigern die Bildung von uPAR

In einem ersten Experiment sollte die Fragen beantwortet werden, inwieweit der uPAR einer Regulation durch freie Fettsäuren unterliegt. Dazu wurden die makrophagenartigen Zellen mit 200 μ M Fettsäure über einen Zeitraum von 48h inkubiert. Als Stimulus wurden die gesättigte Fettsäure Palmitat (16:0), die einfach ungesättigte Fettsäure Oleat (18:1), sowie die zweifach ungesättigte Fettsäure Linolenat (18:2) eingesetzt. Diese Fettsäuren bilden den Hauptbestandteil des humanen Fettsäurepools unter ausgeglichenen Ernährungsbedingungen. Bei der Auswertung der Experimente zeigte sich, daß auf mRNA-Ebene alle eingesetzten Fettsäuren in der Lage waren, die uPAR-Expression zu steigern. Palmitat verursachte eine ca. 3fache Steigerung gegenüber des Ausgangswertes (306% \pm 30%). Die Inkubation mit den ungesättigten Fettsäuren Oleat und Linolat stimulierte die uPAR-Bildung auf 151,9% (\pm 11%) bzw. 167% (\pm 20,5%) verglichen zur Basisinkubation mit fettfreiem BSA. Es fiel weiterhin auf, daß die Effekte der Fettsäuren untereinander signifikant verschieden waren. Palmitat steigerte die uPAR-Bildung signifikant stärker als die einfach ungesättigte Ölsäure.

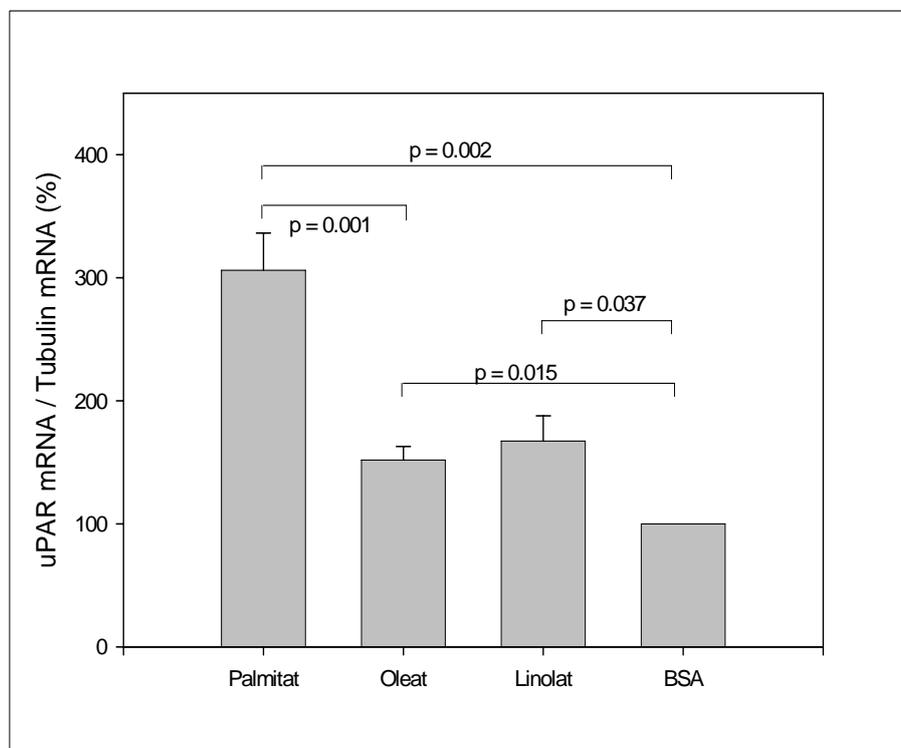


Abb. 4.1.a. : Freie Fettsäuren stimulieren die uPAR Expression auf mRNA-Ebene. Dargestellt sind die Mittelwerte der Experimente + Standardabweichung, sowie das Signifikanzniveau.

Auf Proteinebene ergab die Auswertung ein anderes Bild: Auch diesmal waren alle getesteten Fettsäuren in der Lage, die uPAR- Bildung zu stimulieren. Palmitat, Oleat und Linolat verursachten eine Steigerung der uPAR-Expression auf 155% ($\pm 26\%$), 156% ($\pm 20\%$) sowie 136 ($\pm 2\%$) gegenüber des Ausgangswertes. Statistisch signifikant war hierbei nur die Steigerung durch Linolsäure. Dies liegt am ehesten in den relativ großen Abweichungen der durch Palmitat und Oleat verursachten Einzelwerte voneinander begründet. So lag die Spannbreite der Messwerte für Palmitat zwischen 109% und 209% und bei Oleat zwischen 121% und 197% bezogen auf den Basiswert. Ungeachtet der fehlenden mathematischen Signifikanz ($p = 0,124$ für Palmitat sowie $p = 0,069$ für Oleat) lässt sich zumindest ein Trend ablesen. Die auf mRNA-Ebene beobachteten Unterschiede zwischen Palmitat und Oleat waren auf Proteinebene nicht mehr detektierbar. Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, daß der Modifikation des uPAR neben transkriptionalen wohl auch posttranskriptionale Mechanismen zugrunde liegen.

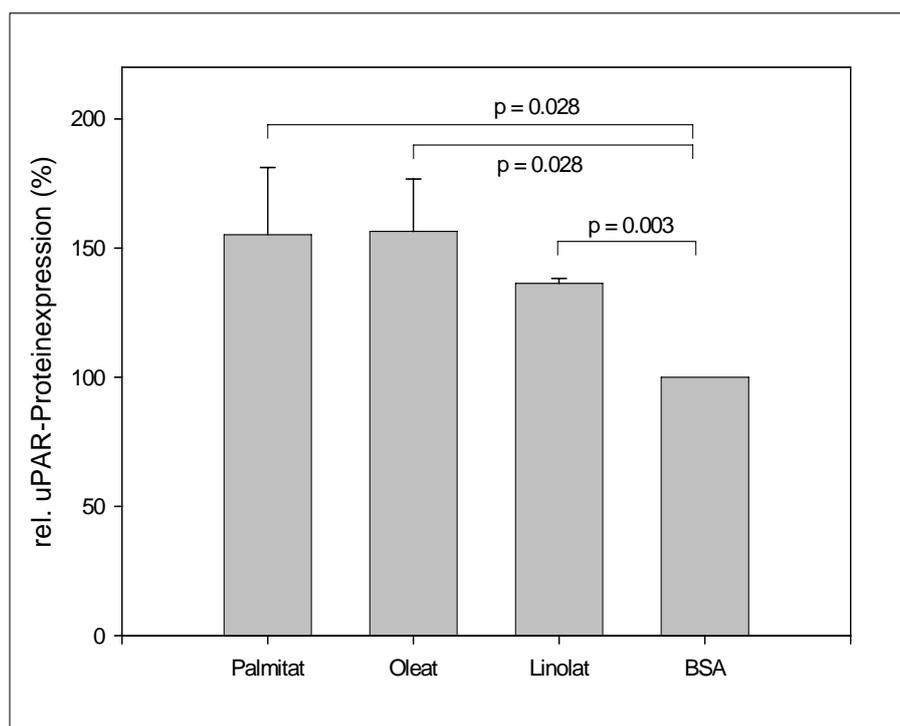


Abb. 4.1.b.: Freie Fettsäuren stimulieren die uPAR-Bildung auf Proteinebene.

4.2. Freie Fettsäuren steigern die uPAR-Expression zeitabhängig

Um die Frage zu beantworten, ob die Regulation der uPAR-Bildung von der Länge der Inkubationszeiten abhängt, wurden ausdifferenzierte U937-Zellen über die Zeiträume 24, 48, 72 und 96h mit 200 μ M Palmitat inkubiert. Als Basis dienten jeweils identische Versuchsansätze mit dem gleichen Volumen an fettfreiem BSA. Bereits nach 24h Inkubation zeigte sich eine deutliche Zunahme der uPAR mRNA auf $162 \pm 12,5\%$, nach 48h war die Menge auf $322 \pm 29\%$ des Basiswertes angestiegen. Nach 72h sowie 96h ließen sich Werte von $62 \pm 10\%$ bzw. $82 \pm 12\%$ messen. Zum Zeitpunkt der Probenentnahme der 48h-Messung wurde in den verbleibenden Versuchsansätzen ein Wechsel des Nährkulturmediums durchgeführt. Der Einbruch der uPAR-Expression zum Zeitpunkt 72h ist wahrscheinlich auf diese Manipulation zurückzuführen. Da die Monozyten mit PMA zu makrophagenartigen Zellen ausdifferenziert wurden und PMA laut verschiedenen Literaturquellen selbst starke Effekte auf die uPAR-Expression ausübt, steht auch eine Art Auswascheffekt des PMA beim Mediumwechsel zur Diskussion. Zusammengefaßt scheint uPAR einer zeitabhängigen Regulation durch freie Fettsäuren zu unterliegen.

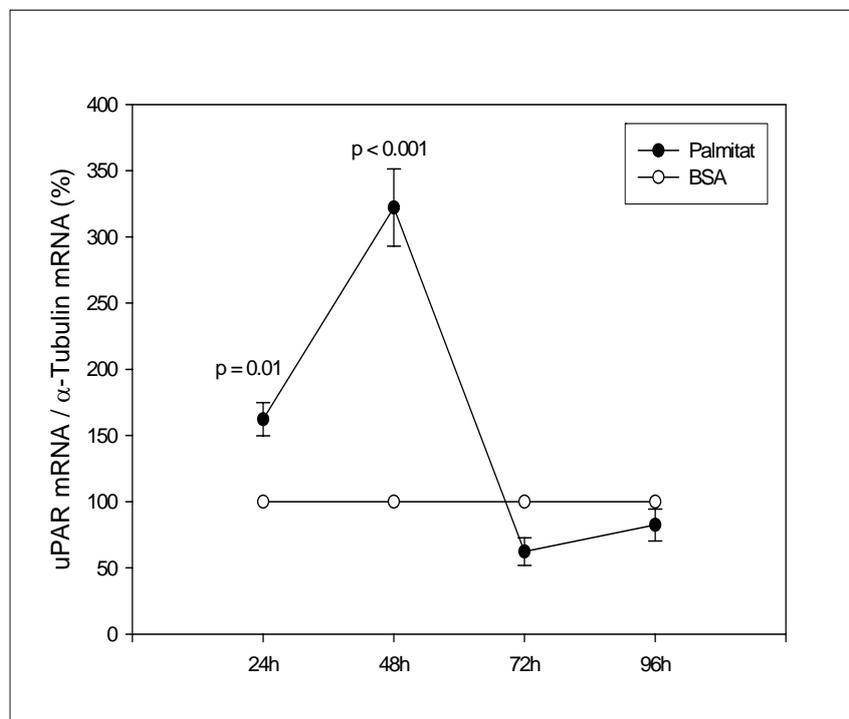


Abb. 4.2.: Palmitat stimuliert die uPAR-mRNA-Expression zeitabhängig. Ausdifferenzierte U937-Zellen wurden mit 200 μ M Palmitat über die Zeiträume 24, 48, 72 sowie 96h inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Experimente \pm Standardabweichung sowie das Signifikanzniveau.

4.3. Freie Fettsäuren steigern die uPAR-Expression konzentrationsabhängig

Es sollte nun geklärt werden, ob sich die Expressionssteigerung durch Erhöhung der Fettsäurekonzentrationen steigern lässt. Die ausdifferenzierten Zellen wurden mit verschiedenen Fettsäurekonzentrationen (25, 50, 100, 200 μM) über einen Zeitraum von 48h inkubiert. Als Vergleich dienten identische Versuchsansätze mit dem jeweilig entsprechenden Volumen an fettfreiem BSA.

Auf mRNA –Ebene bewirkte die Stimulation mit 25 bzw. μM Palmitat keine Steigerung der Expression. Das Expressionsniveau blieb mit 99,8% ($\pm 8,4\%$) bzw. 102,6% ($\pm 10,9\%$) gegenüber des Ausgangswertes relativ konstant. Die Inkubationen mit 100 bzw. 200 μM Palmitat bewirkten eine deutliche uPAR-Expressionssteigerung auf 180,6% ($\pm 2,6\%$) bzw. 309,8% ($\pm 37,6\%$) des Ausgangswertes.

Auf Proteinebene ergab sich ein ähnliches, wenn auch weniger eindrucksvolles Bild.

Während die Inkubation mit 25, 50 und 100 μM Palmitat zu keiner Expressionssteigerung führten (112 $\pm 15\%$; 99 $\pm 9,2\%$; 97 $\pm 5,2\%$) vermochte die Konzentration von 200 μM Palmitat die uPAR-Proteinexpression effektiv auf 168 $\pm 14,7\%$ zu steigern.

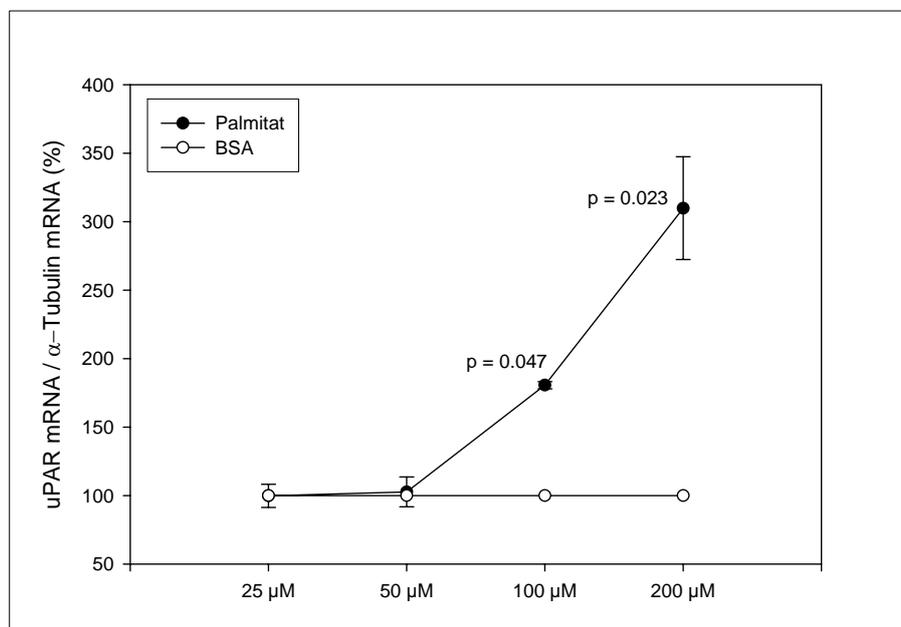


Abb. 4.3a: Palmitat reguliert die uPAR-mRNA-Bildung konzentrationsabhängig.

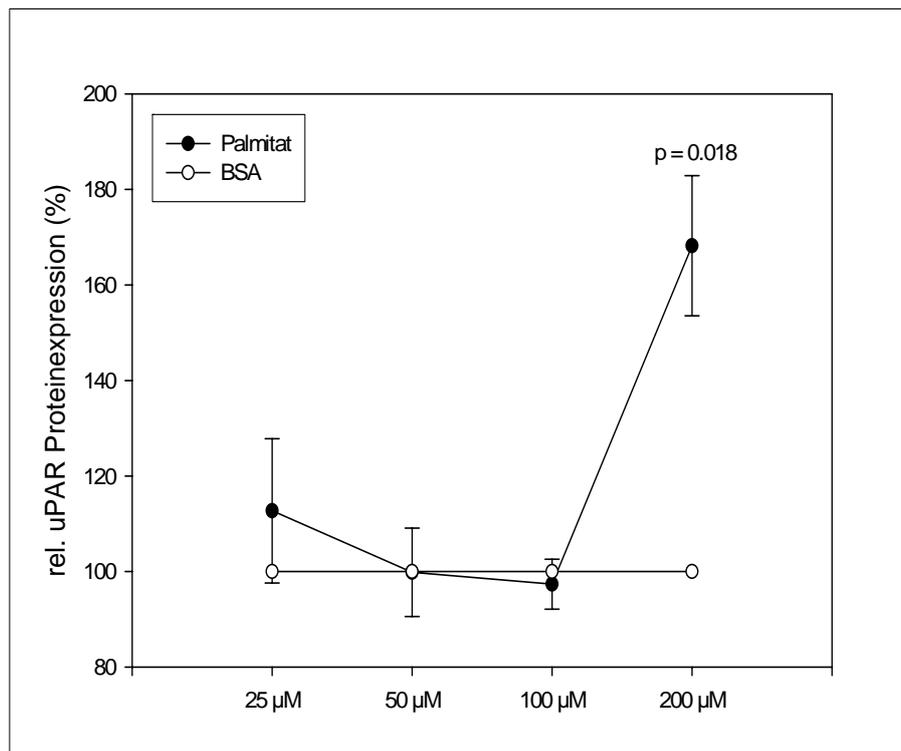


Abb. 4.3b: Die Regulation der uPAR-Proteinsynthese durch Palmitat ist konzentrationsabhängig.

4.4. Rosiglitazon senkt die durch Palmitinsäure hervorgerufene uPAR-Expression auf mRNA-Ebene

PPAR's (peroxisome-proliferator-activated-receptors) sind eine Untergruppe der Familie der Kernrezeptoren und regulieren Genexpressionen. Bisher sind 3 verschiedene PPAR's beschrieben: PPAR α , β (manchmal auch als PPAR δ oder NUC-1 bezeichnet) und PPAR γ (γ 1, γ 2, γ 3 entstehen durch alternatives Splicing). Sie unterscheiden sich vor allem in ihrer Lokalisation und biologischen Funktion. PPAR γ wird vor allem in Fettgewebe, Gefäßendothel, in der pankreatischen β -Zelle und in Makrophagen exprimiert. Thiazolidindione, unter ihnen auch Rosiglitazon, sind synthetische Liganden für PPAR γ und werden als orale Antidiabetika eingesetzt.

Dem PPAR γ werden atheroprotektive Eigenschaften zugeschrieben (81). Es gibt verschiedene Ansätze, wie sie das pathologische Geschehen günstig beeinflussen können.

Ziel der folgenden Experimente war, die Wirkung des PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon auf die FS- bedingte uPAR Hochregulation zu untersuchen. Rosiglitazon wurde in DMSO gelöst und in einer Endkonzentration von 10 μ M eingesetzt. Bei der Verdünnung wurde weiterhin darauf geachtet, dass die Endkonzentration von DMSO 0,1% (v/v) nicht überschritt. Da

Palmitinsäure stets starke Effekte zeigte und als gesättigte Fettsäure relativ stabil gegenüber Oxidation ist, wurde sie als Stimulus in einer Konzentration von 200 μ M eingesetzt. Um neben den stimulierten Bedingungen auch die basalen Effekte von Rosiglitazon auf die uPAR-Expression beurteilen zu können, wurden in Parallelansätzen nur Inhibitor und Rosiglitazon inkubiert. Um auszuschließen, dass es sich möglicherweise um Effekte des Lösemittels handelt, wurde weiterhin parallel mit Fettsäure und DMSO inkubiert. Die Protein- und RNA-Extraktion wurde nach einer Inkubationszeit von 48h vorgenommen.

Die Analyse der Experimente ergab, dass Rosiglitazon die uPAR-Expression zu beeinflussen vermag. Auf mRNA-Ebene konnte unter Rosiglitazon-Stimulation eine signifikante Reduktion der uPAR mRNA-Bildung beobachtet werden. Die vergleichende Analyse der BSA inkubierten U937 Zellen mit den BSA/Rosiglitazon –stimulierten ergab, dass der PPAR γ -Agonist in der Lage war, die uPAR-mRNA-Expression um durchschnittlich ca. 30% zu reduzieren.

Die durch Palmitinsäure induzierte Expressionssteigerung wurde unter Rosiglitazon-Inkubation aufgehoben.

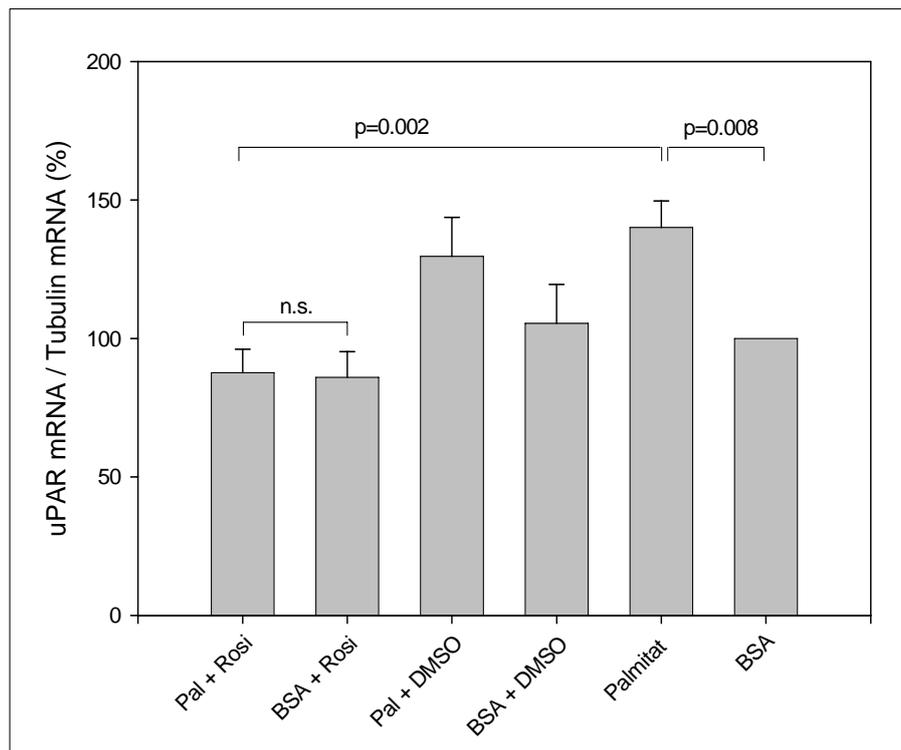


Abb. 4.4.: Rosiglitazon hebt die Effekte des Palmitat auf mRNA-Ebene auf. Pal.: Palmitat 200 μ M, Rosi: Rosiglitazon 10 μ M, DMSO: 0,1% (v/v), BSA 200 μ M, n.s.: nicht signifikant

4.5. PPAR's unter dem Einfluss freier Fettsäuren

Ziel dieser Experimentenserie war es zu untersuchen, wie die exogene Applikation der gesättigten C:16 Fettsäure Palmitat die mRNA-Expression von PPAR α , PGC1 und PPAR γ in der humanen promyeloiden Leukämiezelllinie U937 zu beeinflussen vermag.

Die 48h Inkubation mit 200 μ M Palmitat führte zu einer signifikanten Reduktion der mRNA-Expression für PPAR γ auf 83% \pm 11% und PGC1 auf 29% \pm 11% gegenüber des Ausgangswertes. Das Expressionsniveau der PPAR α mRNA blieb mit durchschnittlich 113 \pm 14% relativ konstant.

Um zu untersuchen, ob diese Effekte durch Metabolisierung der Fettsäure zustande kommen, wurde der Versuch mit dem nichtverstoffwechselbaren Analogon Bromopalmitat in gleicher Konzentration und Inkubationsdauer wiederholt.

Die Stimulation mit Bromopalmitat führte zu einer Reduktion der mRNA-Expression auf 62% \pm 5% für PPAR γ sowie 15,8 \pm 1,6% für PGC1. Die PPAR α -mRNA-Menge blieb mit 97% \pm 8,5% erneut relativ konstant.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, daß die mRNA der Gruppe der Peroxisome Proliferator Activated Receptors durch die Fettsäure Palmitat reguliert wird. Da auch das nichtverstoffwechselbare Palmitinsäureanalogon Bromopalmitat in der Lage ist, die Genexpression zu beeinflussen, scheint der Fettsäure selbst hierbei eine Schlüsselrolle zuzukommen.

Obwohl PGC1 als transkriptionaler Koaktivator von beiden hier untersuchten PPAR's beschrieben ist, bleibt das Expressionslevel für PPAR α während des Versuches relativ konstant, PPAR γ hingegen ist supprimiert. Diese Beobachtungen könnten erklärt werden durch Effekte der Fettsäure auf zusätzliche Co-Faktoren bei der Regulation von PPAR γ und PPAR α .

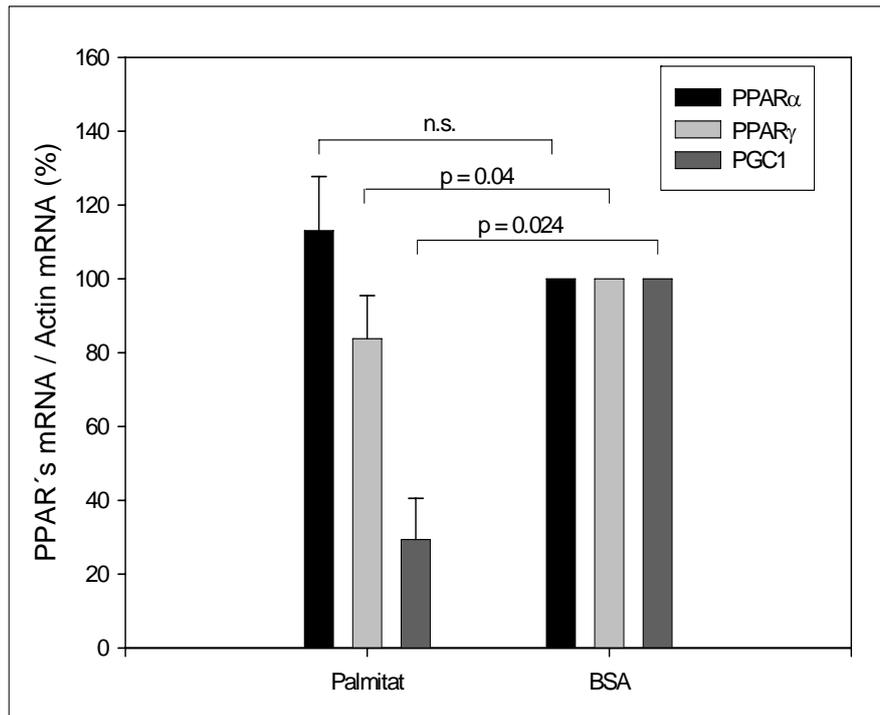


Abb. 4.5a: PPAR γ und PGC1 werden durch freie Fettsäuren reguliert. Die Inkubation mit 200 μ M Palmitat über 48h führte zu einer signifikanten Reduktion der PPAR γ und PGC1-mRNA Bildung. Abkürzungen: n.s.= nicht signifikant

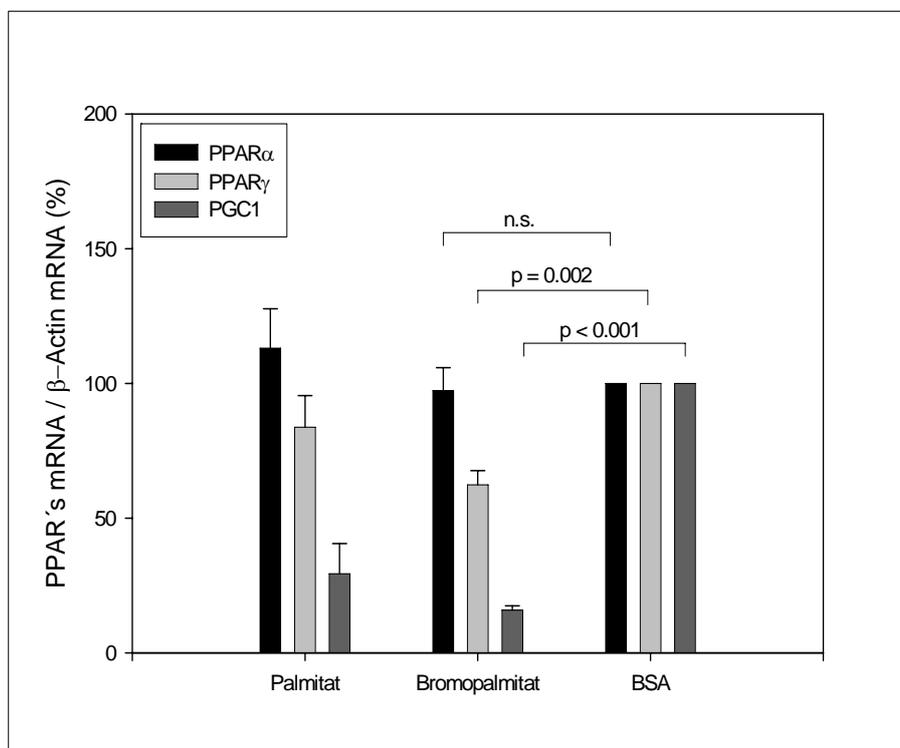


Abb. 4.5.b: PPAR's werden unabhängig von einer gesteigerten Metabolisierung durch freie Fettsäuren reguliert. Das nichtverstoffwechselbare Fettsäureanalogon Bromopalmitat vermag die gleichen Effekte auszulösen wie sein metabolisierbares Korrelat. Abkürzungen: n.s.= nicht signifikant

4.6. Die Expressionssteigerung des uPAR durch freie Fettsäuren erfolgt unabhängig des PKC Signalweges

In den vorherigen Ergebnissen zeigte sich deutlich, dass die uPAR-Expression durch freie Fettsäuren gesteigert werden kann. Über welchen Signaltransduktionsweg diese Effekte vermittelt werden, sollte in einer weiteren Versuchsreihe untersucht werden. Durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren für verschiedenen Signalwege kann einer solchen Fragestellung nachgegangen werden. Derartige Inhibitoren sind in der Lage, in einer Übertragungskaskade ein Enzym zu blockieren und somit die Transduktion zu unterbinden. Durch Zugabe der Stimulans und gleichzeitiges Blockieren eines spezifischen Übertragungsweges wäre im Falle einer Beteiligung mit einem Erlöschen des Effektes zu rechnen.

Es wurden die Effekte des PKC Signalweges untersucht.

Als spezifischer Inhibitor wurde GFX als Inhibitor von PKC α , PKC β 1, PKC δ , PKC ϵ , sowie PKC ζ , eingesetzt (82).

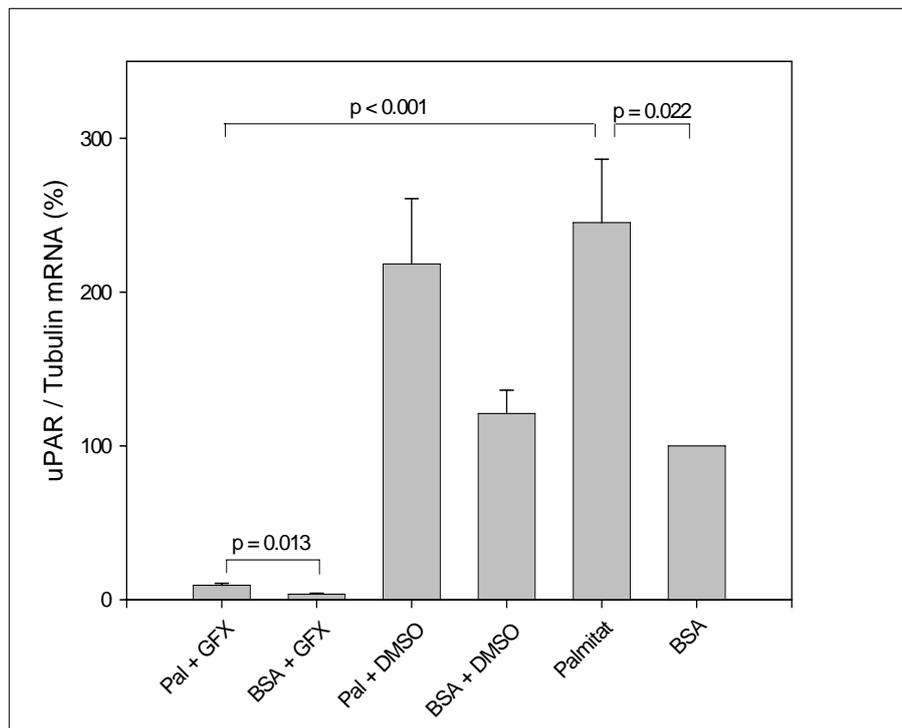
Als Basis für diese Experimente dienten ausdifferenzierte U937-Zellen in Standardmedium mit fettfreiem BSA. In verschiedenen Ansätzen wurden 200 μ M Palmitat mit/ohne Inhibitor sowie entsprechenden Kontrollen über einen Zeitraum von 48h substituiert.

Die Inhibitoren wurden in DMSO gelöst und in Anlehnung an die Experimente anderer Arbeitsgruppen in einer Endkonzentration von 10nM in den Zellkulturexperimenten eingesetzt. Es wurde darauf geachtet, dass das die Endkonzentration von DMSO im Versuchsansatz 0,1% (v/v) nicht überschritt. Um die Effekte des DMSO nachvollziehbar zu machen, wurde in einem Parallelansatz mit dem identischen DMSO-Volumen ohne Inhibitor inkubiert.

Die Analyse der Experimente ergab, daß die basale uPAR-Expression einer deutlichen Regulation durch die Proteinkinase C zu unterliegen scheint. Die Zugabe des Inhibitors führte auf mRNA-Ebene zu einer drastischen Reduktion der basalen uPAR-Expression auf 3,6% (\pm 0,65%) des Ausgangswertes (100%). Die alleinige Inkubation des Lösemittels (DMSO) hatte keinen signifikanten Effekt (121 \pm 15%). Unter Stimulation mit 200 μ M Palmitat bewirkt die Inhibition des PKC-Signalweges eine Abnahme der uPAR-Expression von 245 (\pm 41%) auf 9,45% (\pm 1,2%). Auch hier zeigt sich, dass die Effekte nicht im DMSO begründet liegen. Die Zugabe von 0,1% DMSO (v/v) führt zu keiner richtungsweisenden Veränderung (218 \pm 42%).

Die Stimulation mit Palmitat führte in diesem Experiment zu einer Steigerung der uPAR-Expression auf 245% ($\pm 41\%$) des Ausgangswertes. Unter GFX führt Palmitat zu einer Zunahme der uPAR-Bildung von 9,45% (1,2%). Vergleicht man die Effekte, die Palmitat auszulösen vermag, fällt auf, daß trotz der Hemmung des PKC-Signalweges die uPAR-Produktion um ähnliche Faktoren zunimmt (Faktor 2,45 basal bzw. Faktor 2,63 unter GFX). Auf Proteinebene ergab sich ein ähnliches, wenn auch weniger eindrucksvolles Bild: Palmitat führte initial zu einer Steigerung der uPAR-Expression auf 125,2% ($\pm 6,7\%$). Nach Blockierung des PKC-Signalweges sank die uPAR-Expression unter BSA-Inkubation auf 30,3% ($\pm 3,5\%$) gegenüber des Ausgangswertes (100%) ab, ließ sich jedoch durch die Stimulation mit Palmitat auf 40,8% (3,5%) steigern. Die Inkubation mit dem Lösemittel des Inhibitors DMSO führte wiederum zu nichtsignifikanten Veränderungen (200 μ M Palmitat + 0,1% DMSO: 127,1% ($\pm 3,7\%$), 200 μ M BSA + 0,1% DMSO: 110,6% ($\pm 7,0\%$)).

A)



B)

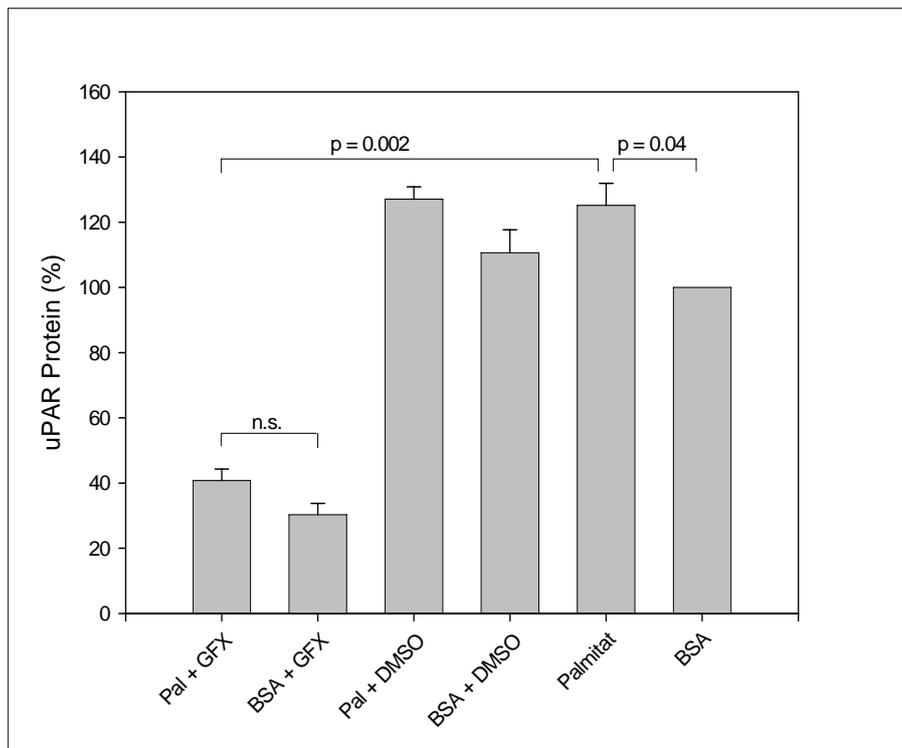


Abb. 4.6.1.: Die basale uPAR-Expression unterliegt einer Regulation durch die Proteinkinase C, nicht aber die Heraufregulation durch Palmitat. A) Die Analyse der mRNA erfolgte mittels RT-Real Time PCR. **B)** Die Untersuchungen auf Proteinebene wurden mittels Western Blot durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Experimente (+ Standardabweichung), sowie das Signifikanzniveau. Pal.: Palmitat 200 μ M, GFX: 10 μ M, DMSO: 0,1% (v/v), BSA: 200 μ M, n.s.: nicht signifikant

4.7. Die Hemmung des p38 MAPK-Signalweges hebt die fettsäureinduzierte uPAR-Expressionssteigerung auf mRNA-Ebene auf

SB 202190 wurde als spezifischer Hemmstoff der SAPK2 (= Stress Activated Protein Kinase 2), auch p38 MAP-Kinase genannt, eingesetzt. SB 202190 hemmt selektiv die α - und β -Isoformen der p38 MAP-Kinase und hat keinen Effekt auf die JNK (=SAPK1), auch p42/p44 Map-Kinase (=MAPK) genannt oder andere assoziierte Proteinkinasen (83, 84).

Die Zugabe des spezifischen Inhibitors des p38 MAPK-Signalweges SB202190 in einer Konzentration von 10 μ M führte zu einer drastischen Reduktion der uPAR-Expression auf mRNA-Ebene auf 68 \pm 7% des Basiswertes. In unstimulierten Zellen (Ansätze mit fettfreiem BSA) führte die Zugabe von SB 202190 zwar auch zu einer Reduktion der Expression, diese lag mit 78,5% (\pm 7,2%) jedoch über den Werten für Palmitinsäureinkubation. Das Lösemittel des Inhibitors hingegen zeigte keinen Effekt, weder in stimulierten (142 \pm 11%) noch in unstimulierten Zellen (143 \pm 6%). Diese Daten weisen deutlich darauf hin, dass der p38 MAPK-Signalweg an der Vermittlung der Signale der durch Palmitat hervorgerufenen Expressionssteigerung (140 \pm 7,5%) beteiligt ist. Wird die Übertragung der Signale über den p38 MAPK-Weg gehemmt, verliert Palmitinsäure die Fähigkeit, die Bildung des uPAR auf mRNA-Ebene zu stimulieren.

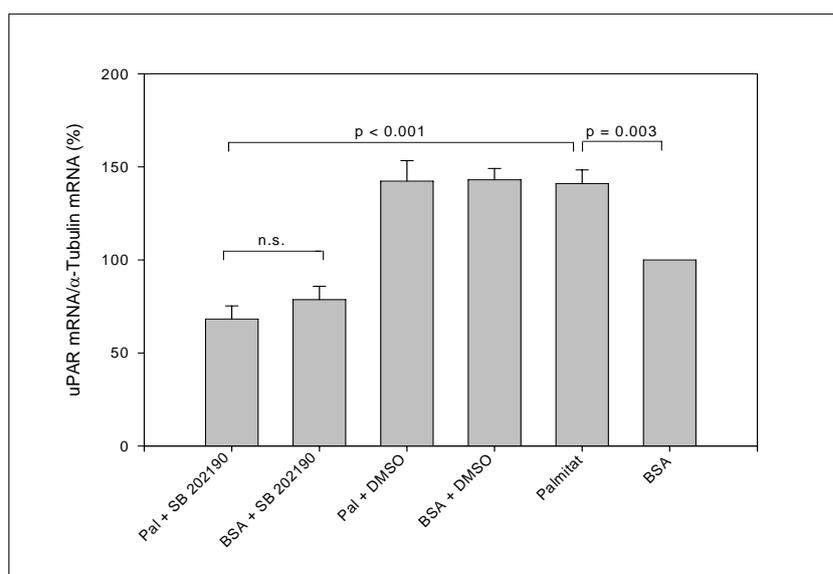


Abb. 4.7.: Palmitat vermittelt seine Effekte über den p38 MAPK Signalweg. Dargestellt sind die Mittelwerte der uPAR mRNA + Standardabweichung, sowie das Signifikanzniveau. Pal.: Palmitat 200 μ M, SB 202190: eingesetzt in einer Konzentration von 10 μ M, DMSO: 0,1% (v/v), n.s.: nicht signifikant

4.8. Die akute Regulation des uPAR durch freie Fettsäuren in vitro

Um eine bessere Vergleichbarkeit mit der in vivo-Situation zu erhalten, wurde auf die Präinkubation mit PMA verzichtet. Undifferenzierte Monozyten wurden über eine Dauer von 4h mit 200 μ M Palmitat inkubiert. Dieser Zeitraum wurde gewählt, da in den humanen Monozyten die uPAR-Expression am stärksten supprimiert war. Es wurden zusätzlich Experimente unter der Zugabe von 0,1 U Heparin durchgeführt. Diese Konzentration entspricht näherungsweise der Plasmakonzentration von Heparin im in vivo Versuch.

In vitro führte die Inkubation mit 200 μ M Palmitat über einen Zeitraum von 4h zu einer signifikanten Steigerung der uPAR-Expression auf $130\pm 12\%$ des Ausgangswertes. Die Zugabe von 0,1 U Heparin verstärkte den Effekt ($163\pm 15\%$). Die alleinige Inkubation mit 0,1 U Heparin hatte keinen signifikanten Effekt ($108\pm 19\%$).

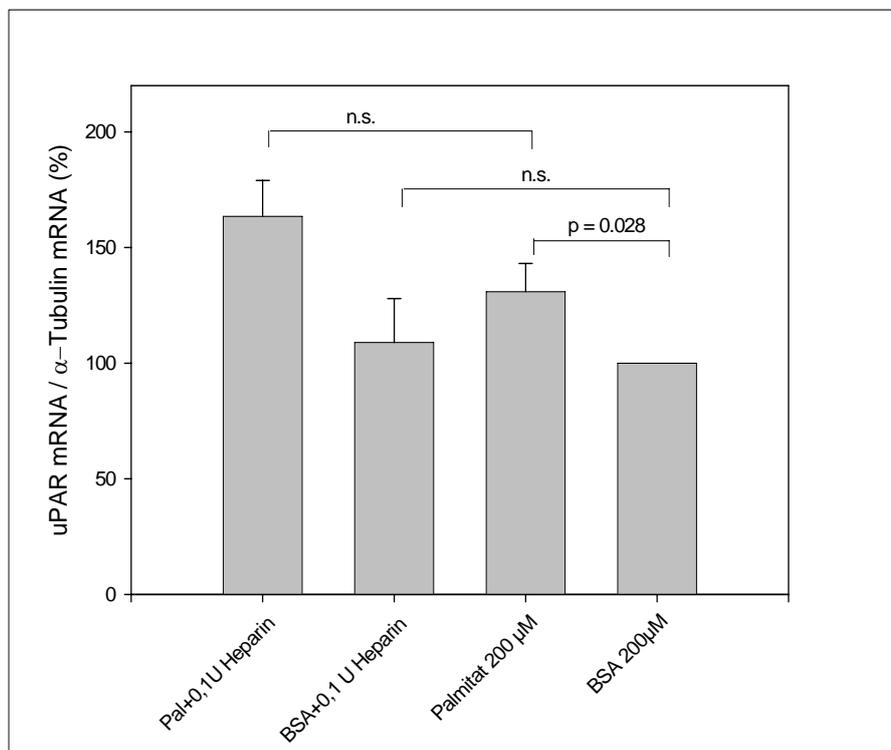


Abb. 4.8.: Die akute Regulation des uPAR in vitro. Über einen Zeitraum von 4h wurden undifferenzierte U937-Zellen mit 200 μ M Palmitat inkubiert. Um die Effekte des Heparins aufzudecken wurden Parallelexperimente unter der Zugabe von 0,1 U Heparin durchgeführt. Pal: Palmitat 200 μ M; n.s.: nicht signifikant.

4.9. Die akute Regulation des uPAR durch freie Fettsäuren in vivo

In einem in vivo Versuch sollte geklärt werden, ob sich die aus den Zellkulturexperimenten gewonnenen Daten auf die Situation im Menschen übertragen lassen.

Periphere mononukleäre Zellen wurden wie unter 3.2.2.2. beschrieben zum Zeitpunkt 0, 120, 240 und 300min gewonnen. Die Analyse erfolgte mittels RT-Real time-PCR. Die relative uPAR-Expression zum Zeitpunkt 0min bezogen auf die α -Tubulin-Expression wurde als Basis für die Auswertung genutzt und gleich 100% gesetzt.

Nach 2 Stunden war die uPAR-Expression auf $73 \pm 9\%$ des Ausgangswertes gesunken und fiel nach 4 Stunden sogar auf einen Wert von $69\% \pm 13,5\%$. Nach 5 h kehrte die uPAR auf ihr Ausgangsniveau zurück $104 \pm 39\%$.

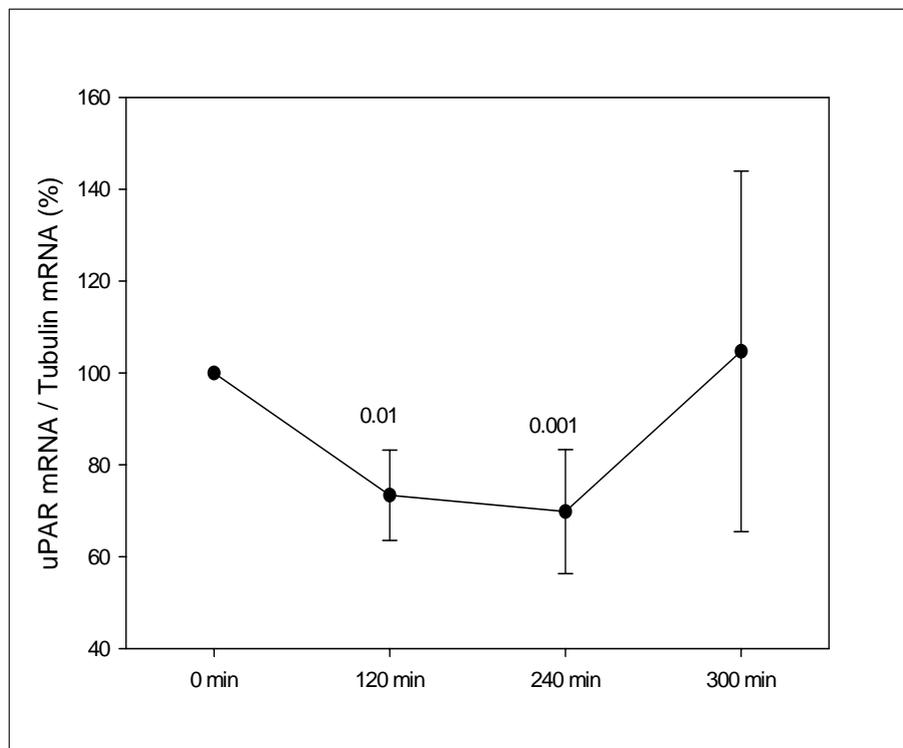


Abb. 4.9.: Die akute Regulation des uPAR durch freie Fettsäuren in vivo.

4.10. uPAR-Effekte als Ergebnis einer gesteigerten Metabolisierung

Um zu überprüfen, ob die bisher beobachteten Effekte durch die Fettsäure selbst oder durch ein bei der Metabolisierung im Mitochondrium entstandenes Produkt ausgelöst wird, wurde die Wirkung des nichtverstoffwechselbaren Analogon Bromopalmitat untersucht. Bromopalmitat kann nicht metabolisiert werden, da es als Palmitinlierungsinhibitor wirkt.

Die mit PMA vorbehandelten Zellen wurden für 48h mit 200 μ M Bromopalmitat inkubiert. Um vergleichbare Bedingungen zu schaffen, wurden in Parallelenansätzen mit je 200 μ M BSA sowie 200 μ M Palmitat inkubiert.

Auf mRNA-Ebene führte Bromopalmitat zu einer signifikanten Reduktion der uPAR-Expression um 15,4 % (\pm 9,75%), während die Inkubation mit Palmitat die Expression auf $208 \pm 22,8\%$ steigern konnte. Auf Proteinebene ergab sich ein anderes Bild: Sowohl Palmitat als auch Bromopalmitat verursachten eine signifikante Mehrexpression des uPAR-Proteins um $25,2 \pm 6,8\%$ bzw. $25,2 \pm 2\%$. Auf transkriptionaler Ebene scheint demnach die Metabolisierung der Fettsäuren eine Bedingung zur uPAR-mRNA-Bildung darzustellen. Posttranskriptional scheinen andere Mechanismen die entsprechenden Signalkaskaden zu aktivieren und somit eine Mehrproduktion des Proteins herbeizuführen.

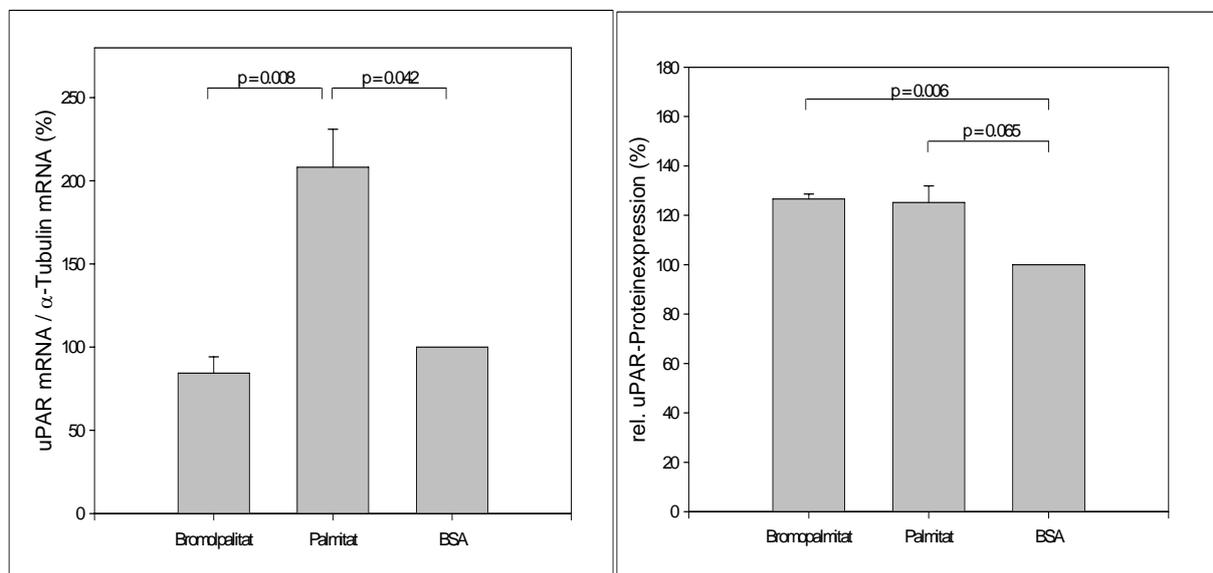


Abb. 4.10: Die Effekte des nichtverstoffwechselbaren Fettsäureanalogon Bromopalmitat auf die uPAR-Expression. Links dargestellt ist das Expressionsniveau auf mRNA-Ebene, rechts die uPAR-Expression auf Proteinebene.

4.11. Komponenten der β -Oxidation unter dem Einfluß von freien Fettsäuren

Fettsäuren, vor allem ungesättigte, sind physiologisch wichtige Liganden für PPAR's. Die Aktivierung der PPAR's kann u.a. zur transkriptionalen Regulation metabolischer Gene, beispielsweise CPT1, FAT/CD36 (fatty acid translocase), PDK4 (Pyruvatdehydrogenase 4) und UCP3 (Uncoupling protein 3) führen (85).

Inwieweit Gene der β Oxidation im in vitro System U937 einer transkriptionalen Regulation durch Fettsäuren unterliegen wurde untersucht. Die Zellen wurden mit 200 μ M der gesättigten Fettsäure Palmitat über einen Zeitraum von 48h inkubiert. Als Kontrolle dienten identische Versuchsansätze mit 200 μ M BSA.

Die Acetyl-CoA-Carboxylase (ACACA) ist ein Schlüsselenzym der Fettsäuresynthese. Es ist eines von 4 bekannten biotinabhängigen Enzymen des menschlichen Organismus. (OMIM)

Das auch als trifunktionales Protein bekannte Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase/3-Ketoacyl-CoA Thiolase/Enoyl-CoA Hydratase (HADHB) katalysiert 3 wichtige Schritte in der mitochondrialen β -Oxidation von Fettsäuren. (OMIM)

Die Carnitin-Palmitoyltrensferase 1 (CPT1) ist an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert und katalysiert den Transfer langkettiger Fettsäuren ins Cytosol von CoA zu Carnitin. Dieses ist die Voraussetzung für die Aufnahme der Fettsäuren in Mitochondrien. Das Enzym gilt als Schrittmacherenzym der Fettsäureoxidation (86).

Seine Expression wird u.a. durch PPAR α reguliert.

1	2	3	4	5	6
	Pal + PMA	BSA + PMA	Pal - PMA	BSA - PMA	p (Spalte 2,4)
ACACA2	34,00 (\pm 4,23)	100	70,31 (\pm 8,30)	79,24 (\pm 7,45)	
	p = 0,001		p = 0,550		0,048
HADHB	69,23 (\pm 7,78)	100	199,02 (\pm 19,74)	278,69 (\pm 23,76)	
	p = 0,058		p = 0,046		0,003
CPT1A	95,51 (\pm 8,54)	100	448,38 (\pm 66,82)	469,90 (\pm 96,15)	
	p = 0,622		p = 0,858		0,002

Abb. 4.11.: Komponenten der β -Oxidation unter dem Einfluss von freien Fettsäuren. Dargestellt sind die relativen mRNA-Mengen der in Spalte 1 aufgelisteten Gene. Die Angaben sind als relativer Anteil mRNA angegeben in % (\pm Standardabweichung) zu verstehen. Abkürzungen: Pal: Palmitat 200 μ M; BSA: bovine serum albumin 200 μ M; Pal+PMA, BSA+PMA: vorherige Ausdifferenzierung zu makrophagenartigen Zellen über 24h mit 100nM PMA; Pal-PMA, BSA-PMA: Undifferenzierte Monozyten (U937)

5. DISKUSSION

Atherosklerose stellt ein erhebliches Gesundheitsproblem dar. Die Folgen der Atherosklerose belasten das amerikanische Gesundheitssystem mit ca. 259 Milliarden Dollar jährlich und sind für über 50% der Sterbefälle verantwortlich (8). Das Metabolische Syndrom (Adipositas, Glucoseintoleranz, Insulinresistenz, Hypertonie, Dyslipidämie) betrifft etwa 25% der über 20jährigen US-Amerikanischen Bevölkerung und erreicht bei den 60-69 Jährigen Werte von über 40% (87). Atherosklerotische Komplikationen werden in dieser Patientengruppe besonders häufig beobachtet.

Neben anerkannten Risikofaktoren wie Rauchen und Bewegungsmangel treten auch die molekularen Effekte, ausgelöst durch westliche Fehlernährung (hochkalorisch, hoher Anteil gesättigter Fettsäuren durch den übermäßigen Verzehr tierischer Produkte, Mangel an protektiv wirkenden Antioxidantien) zunehmend in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Vergleichende Studien konnten belegen, dass die Kumulation von Erkrankungen des atherosklerotischen Formenkreises nicht durch genetische Variationen zwischen verschiedenen Bevölkerungsgruppen erklärbar ist. Besonders im Mittelmeerraum fällt eine zum Rest Europas und den USA signifikant niedrigere Atheroskleroseprävalenz ins Auge. Ein wesentlicher Unterschied der so genannten mediterranen Diät im Vergleich zur westlichen Ernährung ist der besonders hohe Anteil von einfach ungesättigten Fettsäuren (8). In einer 1999 erschienenen Studie wurde gezeigt, dass die Inkubation glatter Muskelzellen (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) mit Oleat die Endothelaktivierung günstig beeinflussen kann. Oleat war in der Lage, die Expression der Adhäsionsmoleküle VCAM-1, E-Selektin und ICAM-1 zu inhibieren. Funktionell konnte gezeigt werden, dass die Adhäsion von Monozyten (unter LPS-Stimulation) an diese Zellen vermindert war (88). Anderen Fettsäuren wiederum werden proatherogene Eigenschaften zugeschrieben. Besonders das atherogene Potential der Linolsäure wird in der Literatur kontrovers diskutiert (89, 90).

Atherosklerose ist charakterisiert durch die Proliferation und Migration verschiedener Zelltypen. Die Monozytenadhäsion an Endothelzellen, deren Differenzierung zu Makrophagen und die anschließende Schaumzellbildung stellen Schlüsselereignisse dar. Neben Wachstumsfaktoren, Matrixmetalloproteinasen und Zytokinen gilt eine Beteiligung des fibrinolytischen Systems an Prozessen der Migration und Proliferation als gesichert (34).

Unter verschiedenen Gesichtspunkten ist das Augenmerk vermehrt auf die Serinprotease uPA und seinen spezifischen Rezeptor uPAR gerichtet worden.

Das Expressionslevel von uPAR ist eng korreliert mit dem migratorischen und invasiven Potential von Zellen, wie vor allem an verschiedene Tumorzellstudien gezeigt werden konnte. Im Tiermodell führt ein Fehlen von uPAR zu einer ausbleibenden Transmigration von Granulozyten/Monozyten bei Peritonitis sowie einer verminderten Leukozytenabwehr bei bakteriellen pulmonalen Infektionen (91, 92).

Dabei stehen die proteolytischen Aktivitäten des Systems nicht immer im Vordergrund (6).

Der uPAR reguliert die Monozytenadhäsion über eine direkte Anbindung an das Matrixprotein Vitronektin sowie die Regulation des β 2-Integrin Lymphozyten-Funktionsassoziierte Antigen 1 (LFA-1) und das Makrophagen-Antigen 1 (MAC-1).

LFA-1 und MAC-1 wiederum binden im Falle von Entzündungen an den endothelialen Rezeptor ICAM-1 und schaffen so die Voraussetzung für die Monozytenrekrutierung (93).

In ApoE^{-/-} Mäusen konnte gezeigt werden, dass uPAR, uPA-unabhängig die Makrophageninfiltration in die Gefäßwand stimuliert (94).

In vivo finden sich erhöhte uPAR-Konzentrationen in Monozyten bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt. Die erhöhte uPAR Expression trägt zur erhöhten Zelladhäsion bei und stellt ein neues mögliches Ziel zur Hemmung der Monozytenrekrutierung bei kardiovaskulären entzündlichen Prozessen dar (93).

Eine Erhöhung freier Fettsäuren im Plasma induziert proinflammatorische Zustände und oxidativen Streß beim Menschen. Tripathy et al. beobachteten einen Anstieg der intranukleären NF κ B Bindungsaktivität und p65 Expression in zirkulierenden mononukleären Zellen sowie eine verstärkte Synthese reaktiver Sauerstoffradikale (ROS; reactive oxygen species) (95). In AGS Zellen (humane Magenadenokarzinom-Zelllinie) konnte gezeigt werden, dass ROS die uPAR-Expression zeit- und konzentrationsabhängig steigern können (96).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die exogene Applikation verschiedenartiger Fettsäuren in der Lage ist, die uPAR Expression auf mRNA- und Proteinebene in ausdifferenzierten U937-Zellen zu steigern.

Diese Effekte sind zeit- und konzentrationsabhängig. Die getesteten Fettsäurekonzentrationen lagen im Bereich von 25-200 μ mol/l. Unter normalen Ernährungsbedingungen liegt die Serumkonzentration freier Fettsäuren zwischen 90 und 1200 μ M (97). Unter pathologischen Bedingungen wie Adipositas, Diabetes Mellitus und Tumorerkrankungen kann die

Konzentration auf 2000 μ M ansteigen (98). Dabei bilden Palmitinsäure (25%), Stearinsäure (10%), Ölsäure(38%) und Linolsäure (22%) den größten Anteil (99). Wegen der geringen Wasserlöslichkeit liegen Fettsäuren im Blut hauptsächlich gebunden vor, größtenteils an Albumin, ungefähr 10% sind an Lipoproteine gebunden. Ein geringer Anteil liegt ungebunden vor. Um diesen Zustand nachzuahmen, wurden in der vorliegenden Arbeit einzelne Fettsäuren in physiologischem Krebs-Ringer-HEPES-Puffer an Albumin gebunden und als Stimulus eingesetzt. Die Konzentration der eingesetzten Fettsäuren ist somit als physiologisch zu betrachten.

Daß der uPAR-mRNA Erhöhung in den Experimenten der Zeitreihe nach initialer Steigerung ein Abfall am Zeitpunkt 72h folgt, ist am ehesten als Auswascheffekt des zur Ausdifferenzierung der Monozyten in makrophagenartigen Zellen benutzten PKC-Aktivators PMA zu werten. Um optimale Wachstumsbedingungen zu schaffen, wurde nach 48h ein Wechsel des Zellkulturmediums vorgenommen. Die bis dahin beobachtete uPAR-Expressionssteigerung fiel zum Zeitpunkt 72h im Vergleich zu früheren Zeitpunkten ab, um danach (96h) wieder anzusteigen. Wie in verschiedenen Studien gezeigt werden konnte, hat PMA selbst starke Effekte auf die uPAR-Expression. Die durch PMA- induzierte Expressionssteigerung des uPAR übersteigt die durch die Fettsäuren ausgelösten Effekte um ein weites. In der Literatur sind Steigerungen um den Faktor 40 beschrieben. Es ist also naheliegend, daß die durch Palmitat ausgelöste Mehrexpression durch das Auswaschen des PMA maskiert wird. Gleichzeitig wird die Relevanz der PKC für die basale uPAR-Synthese unterstrichen, die in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte (100, 101).

In Ergänzung der in-vitro Ergebnisse sollte untersucht werden, inwieweit die gewonnenen Daten auf in vivo Situationen übertragbar sind. Einer kleinen Gruppe gesunder männlicher Probanden wurde hierzu kontinuierlich unter Heparin-gabe eine definierte Menge hauptsächlich gesättigter Fettsäuren infundiert und die uPAR mRNA-Expression in aus Vollblut gewonnenen Monozyten gemessen. Überraschend beobachten wir über den Zeitraum von 4h eine kontinuierliche Suppression der uPAR Expression, erst nach 6 Stunden kam es wieder zu einem Anstieg, wobei dieser nicht über das Ausgangsniveau hinausging. Diese Ergebnisse sind nicht kongruent mit den in-vitro Daten, wofür es mehrere Gründe geben könnte. Erstens wurden die uPAR-Bestimmungen in nicht-ausdifferenzierten Monozyten durchgeführt. Dies ist als wesentliche Ursache für den unterschiedlichen Effekt unwahrscheinlich, da auch bei nicht-ausdifferenzierten U937-Zellen ein Anstieg der uPAR-Expression durch Palmitat beobachtet werden konnte. Weiterhin könnte es im Rahmen der

Aufreinigung zu einer Modifikation der uPAR-Expression gekommen sein, welche auch einen Fettsäure-abhängigen Effekt modifizieren könnte. Dies würde beispielsweise voraussetzen, dass es durch die Aufreinigungsmethode zu einer Beeinflussung der uPAR-Expression kommt und diese Effekte durch vorherige Fettsäuregabe modifiziert wird. Zuletzt könnten in vivo zusätzliche Faktoren, wie z.B. zirkulierende Hormone vorliegen, die die Reaktion auf Fettsäuren in Monozyten modifizieren oder verlangsamen. So ist z.B. bekannt, dass durch das Anlegen einer Verweilkanüle eine Entzündungsreaktion ausgelöst, die mögliche Fettsäureeffekte maskieren könnte. Solche Mechanismen sind speziell für IL-6, welches vermehrt durch die Anlage von Verweilkathetern freigesetzt wird, und uPAR gezeigt (102).

Viele Jahre lang wurde davon ausgegangen, dass die Anpassung an Umgebungsfaktoren (wie Ernährung) bei Säugetieren vor allem über hormonelle und neuronale Signale stattfindet. Inzwischen ist bekannt, dass zahlreiche Makronährstoffe (Glukose, Fett- und Aminosäuren), aber auch sog. Mikronährstoffe (Eisen und Vitamine) in der Lage sind, hormonunabhängig Genexpression zu regulieren. Dabei scheint bei Fettsäuren ihre Qualität eine besondere Rolle zu spielen. Nichtveresterte Fettsäuren gelangen über Fettsäuretransporter in die Zelle. Unter Beteiligung der Acetyl-CoA-Synthase werden sie schnell in Fett-Acyl-CoA-Thioester umgewandelt. Derartig modifiziert, können verschiedene Stoffwechselwege eingeschlagen werden (β -Oxidation, Elongation, Triglycerid-/Cholesterolsynthese, Prostanoid- bzw. Leukotriensynthese). Jedes Zwischen- oder Endprodukt kann theoretisch die transkriptionalen Effekte der Fettsäuren auslösen. Aus der Literatur ergeben sich diesbezüglich unterschiedliche, teilweise widersprüchliche Aussagen. Es scheint jedoch unbestritten, dass die Effekte sehr zellspezifisch sind.

Mindestens 4 verschiedene Transkriptionsfaktorfamilien sollen an der Regulation der Transkription beteiligt sein: PPAR, LXR (liver x receptor), HNF-4 α (hepatic nuclear factor 4 α), und SREBP (sterol regulatory element binding protein). Andere mögliche Kandidaten sind Transkriptionsfaktoren der Klassen RXR (cis-retinoic acid activated receptor) oder FABP/ACBP (fatty acid binding protein/ acyl-CoA binding protein) (103).

PPAR's stellen eine Untergruppe von Kernrezeptoren dar. Sie regulieren Genexpressionen, nachdem sie Liganden gebunden haben. Die Ligandenbindung führt zu einer Konformationsänderung, welche die Rekrutierung von Koaktivatoren ermöglicht.

Die biologische Wirkung der PPAR's wird über Transaktivierung und Transrepression vermittelt. Die Transaktivierung setzt eine Heterodimerisation mit dem RXR (Retinoid X

Receptor) voraus. Über die Bindung PPRE (PPAR response elements) erfolgt die Transkription entsprechender Zielgene. Bei der Transrepression werden durch PPAR's andere Signaltransduktionswege downreguliert. Man nimmt an, daß dieser Mechanismus hauptsächlich den antiinflammatorischen Eigenschaften der PPAR's zugrunde liegt (81).

PPAR α regulieren vor allem den Fettsäurekatabolismus in Leber, Herzmuskel, Nieren und Gefäßwand.

PPAR α –Agonisten (Fibrate) haben gute lipidsenkende Eigenschaften und werden im klinischen Gebrauch gern zur Reduktion des kardiovaskulären Risikos bei Patienten mit Metabolischem Syndrom oder Typ II Diabetes eingesetzt. Neben der Wirkung auf das Lipidprofil haben sie günstige Eigenschaften bzgl. der Reduktion kardiovaskulärer Komplikationen. Die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren (Il-6, COX-2) wird über eine Downregulation der NF κ B und AP-1 Signalwege gehemmt, die Fibrinolyse wird stimuliert und über eine Hemmung der Sekretion bzw. Freisetzung von Endothelin-1 aus Endothelzellen wird der Vasokonstriktion entgegengewirkt (104, 105).

PPAR γ Agonisten (Glitazone) werden vor allem als orale Antidiabetika eingesetzt. Neben positiven Effekten auf die Glukosehämostase beeinflussen sie den Fettstoffwechsel positiv. Es sind weiterhin Effekte auf Vasokonstriktion und Inflammation beschrieben. Die Inhibition von Monozytenchemotaxis, Proliferation und Migration glatter Muskelzellen in die Gefäßwand und die verminderte Produktion von Adhäsionsmolekülen (VCAM-1) und Metallproteinasen (MMP-9) durch Stimulation der PPAR γ konnte v.a. tierexperimentell belegt werden (104). In Schaumzellen bewirkt ihre Aktivierung die Hemmung der Expression verschiedener Gene, die im direkten Zusammenhang mit Atherosklerose stehen.: NO-Synthase, MMP-9 und Scavenger-Rezeptor A (105).

PPAR's werden in Gefäßendothelzellen, glatten Muskelzellen, Monozyten und Makrophagen/Schaumzellen exprimiert.

Der Peroxisome Proliferator-activated receptor-gamma, coactivator 1 (PGC1) ist ein transkriptionaler Koaktivator für PPAR's. Die über PPAR's vermittelte fettsäureinduzierte Genexpression wird durch PGC1 verstärkt (85).

Zu den durch Fettsäuren vermittelten Effekten gehört u.a. die Kontrolle der Gene, die für Proteine ihres eigenen Stoffwechsels kodieren. Besonders die PPAR's werden mit diesem Geschehen in Verbindung gebracht.

Djouadi et al. zeigten 1998 an einem PPAR α knock out Mausmodell eindrucksvoll deren Relevanz. Derartig modifizierte Mäuse fielen durch eine verminderte β -Oxidation sowie verminderte Expression den Lipidstoffwechsel regulierender Proteine auf und zeigten eine gesteigerte Lipidakkumulation in Herz- und Lebergewebe (106).

Watt und seine Kollegen zeigten in einer 2004 erschienenen Studie, dass eine Suppression der Plasmaspiegel freier Fettsäuren zu einer mRNA Hochregulation von PPAR α , δ , sowie deren Koaktivator PGC1 im menschlichen Skelettmuskel kommt. Er zeigte weiterhin, dass einige von ihm untersuchte lipidregulierende Gene nicht betroffen waren (85). Die Applikation von Palmitinsäure führte zu einer drastischen Reduktion der PGC1- mRNA-Expression. Die PPAR γ -Expression war weniger stark und dennoch signifikant erniedrigt. PPAR γ gilt als negativer Regulator der Makrophagenaktivierung (1). Zusammen mit der gesteigerten Expression von uPAR unter Palmitatexposition in Monozyten/Makrophagen lässt sich ein möglicher molekularer Mechanismus postulieren, über den PPAR γ die Atheroskleroseprogression zu beeinflussen vermag. Ob PPAR γ in der Tat direkte Effekte auf die Expression von uPAR hat bleibt jedoch spekulativ. Promoterstudien könnten diese Frage beantworten, wurden aber in dieser Arbeit nicht durchgeführt und sind auch in der Literatur nicht beschrieben. Die PPAR α Genexpression änderte sich durch Zugabe von Palmitat unter den durchgeführten experimentellen Bedingungen nicht. Es ist bekannt, dass freie Fettsäuren PPAR α aktivieren können. Es bleibt aber anzumerken, dass diese Effekte zeitabhängig sind und sich in verschiedenen Zellsystemen unterscheiden. In pankreatischen β -Zellen beispielsweise, führt eine Kurzzeitinkubation mit 250 μ M Palmitat von 8h zu einer Expressionssteigerung, während länger dauernde Stimulation eine Suppression des Transkriptionsfaktors auszulösen vermag (107). PPAR α ist hauptsächlich in der Leber expremiert und reguliert dort Gene, die im Lipoproteinstoffwechsel eine Rolle spielen. PPAR α ist auch in Monozyten und Makrophagen expremiert, wenn auch die Rolle dort unklar ist. Die Verbindung zwischen uPAR und dem Transkriptionsfaktor PPAR α ist unklar. Aus den Ergebnissen der durchgeführten Experimente lässt sich keine offensichtliche Beziehung zwischen PPAR α und uPAR im untersuchten Monozyten/Makrophagensystem ableiten. Dies könnte allerdings zumindest teilweise in den experimentellen Bedingungen, wie zum Beispiel den gewählten Inkubationszeiten liegen.

Thiazolidindione sind selektive Liganden für PPAR γ . Rosiglitazon ist wohl einer der bekanntesten Vertreter dieser Medikamentenklasse. PPAR γ , besonders die Isoform 1 wird in Monozyten exprimiert. In klinischen Studien konnte die Reduktion freier Fettsäuren im Plasma unter Thiazolidindionmedikation beschrieben werden. Die sog. „*fatty acid steal*“-Hypothese geht davon aus, daß Thiazolidindione die Fettsäureaufnahme ins Fettgewebe beschleunigen und somit zu einer Reduktion der freien Fettsäurespiegel im Plasma beitragen. Die antiatherogenen Eigenschaften von Rosiglitazon könnten auch PPAR-unabhängig vermittelt werden.

Beobachtete Effekte aus klinischen Studien waren die Reduktion von PAI-1, MMP-9, CRP und Il-6-Spiegeln im Plasma von Patienten unter Rosiglitazon-Medikation (81, 108-110). Direkte antiatherosklerotische Wirkungen sind weiterhin eine erhöhte NO-Bioverfügbarkeit, verminderte Leukozyten/Endothelzellinteraktion, reduzierte Migration endothelialer glatter Gefäßmuskelzellen und reduzierter Cholesterolefflux aus Makrophagen (111). Eine andere Studie beschreibt eine Reduktion der Aktinpolymerisation in Monozyten durch Rosiglitazon unter Modifikation der PI₃-Kinase-abhängigen Aktinphosphorylierung und der intrazellulären Calciumkonzentration (112).

In der vorliegenden Arbeit wurde unzweifelhaft gezeigt, dass Rosiglitazon in der Lage ist die fettsäureinduzierte uPAR-Expressionssteigerung zu hemmen. Wie diese Effekte vermittelt werden, kann mit dem vorliegenden Versuchsaufbau nicht beurteilt werden.

Durch den Einsatz des nichtverstoffwechselbaren Fettsäureanalogon Bromopalmitat konnte gezeigt werden, daß die bisher beobachteten Effekte zumindest partiell stoffwechselabhängig waren. Damit wird ein in der Literatur immer wieder diskutierter direkter Effekt von Fettsäuren auf die Modifikation verschiedener Gene im untersuchten System unwahrscheinlich. Um einen Eindruck zu gewinnen, inwieweit sich das metabolische Profil der Zellen unter Fettsäureinkubation ändert, wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Schrittmacherenzyme der Fettsäurebetaoxidation untersucht.

Zunächst fällt der signifikante Unterschied zwischen dem Expressionsniveau der untersuchten Gene in undifferenzierten gegenüber PMA-präinkubierten U937 Monozyten/Makrophagen ins Auge.

Da sich die Untersuchungen auf mRNA Ebene beschränken und nur die Effekte der gesättigten Fettsäure Palmitat untersucht wurden, ist das metabolische Profil nur begrenzt beurteilbar.

Diabetes und Insulinresistenz sind gekennzeichnet durch erhöhte Plasma- und Gewebekonzentrationen an Glucose und NEFA. Diabetiker weisen eine chronische Aktivierung der PKC auf. Es gibt verschiedene Beobachtungen, wie die Aktivierung der PKC zur Stimulation proatherogener Mechanismen bzw. Hemmung antiantherogener Mechanismen beitragen kann.

Eine Erhöhung freier Fettsäuren in Plasma führt über verschiedene Zwischenschritte zur vermehrten de novo Synthese von DAG (Diacylglycerol). Bei Säugetieren sind 10 verschiedene PKC-Isoformen beschrieben, von denen 8 durch DAG aktiviert werden können (113).

Beim Menschen ist die Translokation der Proteinkinase C Isoformen $\beta 2$ und δ vom Zytosol zur Membranfraktion durch freie Fettsäuren beschrieben (114).

Eine Aktivierung der PKC wird mit proatherogenen Ereignissen in Zusammenhang gebracht. Bekannte Folgeeffekte der PKC-Aktivierung sind NADPH Oxidase Aktivierung und – Induktion in glatten Gefäßmuskel- und Endothelzellen, Einflüsse auf die Produktion verschiedener Vasodilatoren und –konstriktoren (NO-Synthase, ET-1, Prostacyclin), die Induktion von Adhäsionsmolekülen (VCAM-1, ICAM-1, E-Selectin, P-Selectin) u.a. durch hohe Glucose- oder Fettsäurespiegel kann durch Zugabe von PKC-Inhibitoren in vitro unterdrückt werden. Auch bei der Aufnahme oxidierter LDL-Partikel durch Monozyten-Makrophagen und daraus resultierender Schaumzellbildung scheint die PKC beteiligt zu sein (113).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen dar, daß die PKC eine wichtige Rolle bei der uPAR-Expression spielt. Eine Hemmung der PKC durch den spezifischen Inhibitor führte zu einer drastischen Reduktion der basalen uPAR-Expression. Die Stimulation mit dem DAG-Analogon PMA führte zu einer eindrucksvollen Expressionssteigerung.

Obwohl eine Aktivierung der PKC durch freie Fettsäuren beschrieben ist, scheint diese jedoch bei der fettsäurebedingten uPAR-Upregulation keine Rolle zu spielen. Eine Hemmung der PKC führte nicht zur Hemmung der uPAR-Stimulation.

Es wurde versucht, die zugrunde liegenden Signalmechanismen der uPAR Aktivierung durch freie Fettsäuren aufzudecken. Im vorliegenden System kommen der Proteinkinase C bei der Vermittlung dieser Effekte keine Schlüsselfunktionen zu.

Der p38 MAP-Kinase Weg wird mit der zytoskelettalen Reorganisation und Migration verschiedener Zelltypen in Verbindung gebracht, kann Genexpression induzieren und andere Signalkaskaden aktivieren (115).

Die p38 MAPK ist als stressaktivierte Kinase bekannt. Stressauslöser sind Hyperglykämie, ROS, durch erhöhte FFA/Hyperglykämie ausgelöster Oxidativer Stress, Osmotischer Stress, Proinflammatorische Zytokine, HSP und UV-Strahlung. Eine chronische Aktivierung dieses Signalweges wird mit verschiedenen Pathologien in Verbindung gebracht, darunter auch Entzündungen, Ischämien, Restenosen und Infektionen (116). In der humanen Prostatakarzinomzelllinie PC3MLN4 führte Hypoxie zu einer drastischen Expressionssteigerung des uPAR. Durch den Einsatz spezifischer Antikörper konnte hierbei eine Beteiligung des klassischen (p42/p44 MAPK oder Erk 1/2) und p38 MAPK-Signalweges nachgewiesen werden (53). In der vorliegenden Arbeit führte die selektive Inhibierung des p38 MAPK Signalweges im in vitro Zellsystem zu einer signifikanten Reduktion der uPAR-Expression auf mRNA-Ebene. In ausdifferenzierten U937 Monozyten scheint dieser Signalweg demnach bei der Regulation der basalen uPAR-Expression eine entscheidende Rolle zu spielen. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die durch Palmitinsäure ausgelösten Effekte zumindest teilweise über die p38 MAK-Signalkaskade vermittelt werden. Die Hemmung des Signalweges führte eindrucksvoll zum Erlöschen des Effektes. Die p38 MAPK kann über die Regulation verschiedener Transkriptionsfaktoren u.a. Zytokinexpression regulieren, die ihrerseits selbst mit atherogenem Potenzial in Verbindung gebracht werden. Ob die beobachteten Effekte tatsächlich zytokinvermittelt sind, bleibt spekulativ, stellt jedoch eine plausible Möglichkeit dar.

Die p38 vermittelte uPAR Regulation durch freie Fettsäuren in Monozyten könnte einen möglichen Pathomechanismus für die frühe Atheroskleroseentstehung darstellen und könnte potentiell neue therapeutische Angriffspunkte für Atheroskleroseprophylaxe und –therapie aufzeigen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Das Verständnis der Arterioskleroseentstehung und Progression ist auch heute noch unvollständig. Obwohl verschiedene Risikofaktoren identifiziert wurden, ist deren molekularbiologische Konsequenz nicht immer geklärt.

Die Migration und Proliferation von Monozyten wird in allen Stadien der Arterioskleroseentstehung beobachtet. Das Urokinase Plasminogen Aktivator System und insbesondere der uPAR sind unmittelbar an Zellproliferations- und Migrationsprozessen beteiligt.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss unterschiedlicher freier Fettsäuren auf die Expression des uPAR in der humanen Monozyten/Makrophagenzelllinie U937 sowie in vivo untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass die alleinige Ausdifferenzierung der Monozyten zu Makrophagen die Expression des uPAR deutlich steigert.

Die untersuchten Fettsäuren steigern diesen Effekt zusätzlich. Interessant war die Beobachtung, dass die einfach ungesättigte Ölsäure gegenüber allen anderen untersuchten Fettsäuren zu einer signifikant geringeren Expressionssteigerung des uPAR führt.

Durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren wurde versucht, die dabei aktivierten Signalkaskaden zu identifizieren. Der PKC-Signalweg wurde mittels GF 109203 X gehemmt. Das Resultat dieser Hemmung war eine starke Reduktion der basalen uPAR-Expression. Die durch Fettsäuren induzierte Heraufregulation von uPAR war jedoch weiterhin nachweisbar.

Auch nach Hemmung des p38 MAPK Signalweges mittels SB 202190 konnte eine starke Reduktion der basalen uPAR-Expression beobachtet werden. Interessanterweise konnte bei diesem Experiment durch Substitution der gesättigten Fettsäure Palmitat keine Steigerung der uPAR-Expression verzeichnet werden.

Peroxisome Proliferator Activated Receptors (PPAR's) regulieren Genexpression nachdem sie Liganden gebunden haben. Thiazolidindione sind synthetische Liganden für PPAR γ . Neben ihrer insulinsensibilisierenden Wirkung werden ihnen antiatherogene Eigenschaften nachgesagt. Die durch Palmitat erzeugte uPAR-Stimulation konnte durch Applikation von Rosiglitazon in therapeutischer Dosis gehemmt werden.

Palmitat führte in ausdifferenzierten Monozyten zu einer signifikanten Suppression von PGC1 und PPAR γ . Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit könnte uPAR transkriptionell durch PPAR γ reguliert werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass erhöhte freie Fettsäuren, welche zum Beispiel im Rahmen des Metabolischen Syndroms zu beobachten sind, in vitro die Bildung des Urokinase Typ Plasminogen Aktivator Rezeptor in Monozyten/Makrophagen begünstigt und darüber potentiell ihr invasives Potential erhöht. Die beobachtete Hochregulation von uPAR durch freie Fettsäuren könnte somit einen wichtigen Link zwischen Metabolischen Syndrom und Atheroskleroseentstehung darstellen. Die beobachtete Modifikation dieser Regulation unter dem Einfluss des Thiazolidinediones Rosiglitazon stellt einen neuen plausiblen Mechanismus dar über den die Thiozolidinedione Fettsäure-spezifischen Effekten entgegenwirken könnten.

7. QUELLENVERZEICHNIS

1. Li AC, Palinski W. Peroxisome proliferator-activated receptors: how their effects on macrophages can lead to the development of a new drug therapy against atherosclerosis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2006;46:1-39.
2. Blasi F. Urokinase and urokinase receptor: a paracrine/autocrine system regulating cell migration and invasiveness. *Bioessays* 1993;15(2):105-11.
3. Lupu F, Heim DA, Bachmann F, Hurni M, Kakkar VV, Kruithof EK. Plasminogen activator expression in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15(9):1444-55.
4. Salame MY, Samani NJ, Masood I, deBono DP. Expression of the plasminogen activator system in the human vascular wall. *Atherosclerosis* 2000;152(1):19-28.
5. Andreasen PA, Egelund R, Petersen HH. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell Mol Life Sci* 2000;57(1):25-40.
6. Preissner KT, Kanse SM, May AE. Urokinase receptor: a molecular organizer in cellular communication. *Curr Opin Cell Biol* 2000;12(5):621-8.
7. Bühling KJ, Lepenies J, Witt K. *Intensivkurs Allgemeine und Spezielle Pathologie*: Urban & Fischer; 2000.
8. Moreno JJ, Mitjavila MT. The degree of unsaturation of dietary fatty acids and the development of atherosclerosis (review). *J Nutr Biochem* 2003;14(4):182-95.
9. Gimbrone MA, Jr. Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Am J Pathol* 1999;155(1):1-5.
10. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000;407(6801):233-41.
11. Cooke JP. Flow, NO, and atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(3):768-70.
12. Nagel T, Resnick N, Atkinson WJ, Dewey CF, Jr., Gimbrone MA, Jr. Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1994;94(2):885-91.
13. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420(6917):868-74.
14. Ghazalpour A, Doss S, Yang X, et al. Thematic review series: The pathogenesis of atherosclerosis. Toward a biological network for atherosclerosis. *J Lipid Res* 2004;45(10):1793-805.

15. Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, Yan ZQ. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res* 2002;91(4):281-91.
16. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340(2):115-26.
17. De Caterina R, Libby P, Peng HB, et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1995;96(1):60-8.
18. Young JL, Libby P, Schonbeck U. Cytokines in the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2002;88(4):554-67.
19. Imhof A, Koenig W. Atherosklerose als inflammatorischer Prozess. *CARDIOVASC* 2003;3(7):30-2.
20. Huo Y, Ley K. Adhesion molecules and atherogenesis. *Acta Physiol Scand* 2001;173(1):35-43.
21. Puente XS, Sanchez LM, Overall CM, Lopez-Otin C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet* 2003;4(7):544-58.
22. Zini JM, Murray SC, Graham CH, et al. Characterization of urokinase receptor expression by human placental trophoblasts. *Blood* 1992;79(11):2917-29.
23. Leake D, Doerr TD, Scott G. Expression of urokinase-type plasminogen activator and its receptor in keloids. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;129(12):1334-8.
24. Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* 2000;14(17):2123-33.
25. Zhou H, Vassalli JD. The receptor for urokinase-type plasminogen activator is expressed during mouse spermatogenesis. *FEBS Lett* 1997;413(1):11-5.
26. Ortega N, Behonick D, Stickens D, Werb Z. How proteases regulate bone morphogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2003;995:109-16.
27. Steins MB, Padro T, Schwaenen C, et al. Overexpression of urokinase receptor and cell surface urokinase-type plasminogen activator in the human vessel wall with different types of atherosclerotic lesions. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2004;15(5):383-91.
28. Duffy MJ. The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy. *Curr Pharm Des* 2004;10(1):39-49.

29. Bruse C, Radu D, Bergqvist A. In situ localization of mRNA for the fibrinolytic factors uPA, PAI-1 and uPAR in endometriotic and endometrial tissue. *Mol Hum Reprod* 2004;10(3):159-66.
30. Bolon I, Zhou HM, Charron Y, Wohlwend A, Vassalli JD. Plasminogen mediates the pathological effects of urokinase-type plasminogen activator overexpression. *Am J Pathol* 2004;164(6):2299-304.
31. Zhou HM, Nichols A, Meda P, Vassalli JD. Urokinase-type plasminogen activator and its receptor synergize to promote pathogenic proteolysis. *Embo J* 2000;19(17):4817-26.
32. Roldan AL, Cubellis MV, Masucci MT, et al. Cloning and expression of the receptor for human urokinase plasminogen activator, a central molecule in cell surface, plasmin dependent proteolysis. *Embo J* 1990;9(2):467-74.
33. Kusch A, Tkachuk S, Haller H, et al. Urokinase stimulates human vascular smooth muscle cell migration via a phosphatidylinositol 3-kinase-Tyk2 interaction. *J Biol Chem* 2000;275(50):39466-73.
34. Kusch A, Gulba DC. [Significance of the uPA/uPAR system for development of arteriosclerosis and restenosis]. *Z Kardiol* 2001;90(5):307-18.
35. Stoppelli MP, Corti A, Soffientini A, Cassani G, Blasi F, Assoian RK. Differentiation-enhanced binding of the amino-terminal fragment of human urokinase plasminogen activator to a specific receptor on U937 monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82(15):4939-43.
36. Min HY, Semnani R, Mizukami IF, Watt K, Todd RF, 3rd, Liu DY. cDNA for Mo3, a monocyte activation antigen, encodes the human receptor for urokinase plasminogen activator. *J Immunol* 1992;148(11):3636-42.
37. Ploug M, Behrendt N, Lober D, Dano K. Protein structure and membrane anchorage of the cellular receptor for urokinase-type plasminogen activator. *Semin Thromb Hemost* 1991;17(3):183-93.
38. Blasi F, Carmeliet P. uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3(12):932-43.
39. Irigoyen JP, Nagamine Y. Cytoskeletal reorganization leads to induction of the urokinase-type plasminogen activator gene by activating FAK and Src and subsequently the Ras/Erk signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;262(3):666-70.

40. Liang OD, Chavakis T, Linder M, Bdeir K, Kuo A, Preissner KT. Binding of urokinase plasminogen activator to gp130 via a putative urokinase-binding consensus sequence. *Biol Chem* 2003;384(2):229-36.
41. Ploug M, Eriksen J, Plesner T, Hansen NE, Dano K. A soluble form of the glycolipid-anchored receptor for urokinase-type plasminogen activator is secreted from peripheral blood leukocytes from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Eur J Biochem* 1992;208(2):397-404.
42. Pyke C, Eriksen J, Solberg H, et al. An alternatively spliced variant of mRNA for the human receptor for urokinase plasminogen activator. *FEBS Lett* 1993;326(1-3):69-74.
43. Ploug M, Gardsvoll H, Jorgensen TJ, Lonborg Hansen L, Dano K. Structural analysis of the interaction between urokinase-type plasminogen activator and its receptor: a potential target for anti-invasive cancer therapy. *Biochem Soc Trans* 2002;30(2):177-83.
44. Ploug M, Rahbek-Nielsen H, Nielsen PF, Roepstorff P, Dano K. Glycosylation profile of a recombinant urokinase-type plasminogen activator receptor expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1998;273(22):13933-43.
45. Behrendt N. The urokinase receptor (uPAR) and the uPAR-associated protein (uPARAP/Endo180): membrane proteins engaged in matrix turnover during tissue remodeling. *Biol Chem* 2004;385(2):103-36.
46. Estreicher A, Wohlwend A, Belin D, Schleuning WD, Vassalli JD. Characterization of the cellular binding site for the urokinase-type plasminogen activator. *J Biol Chem* 1989;264(2):1180-9.
47. Duffy MJ, Duggan C. The urokinase plasminogen activator system: a rich source of tumour markers for the individualised management of patients with cancer. *Clin Biochem* 2004;37(7):541-8.
48. Mondino A, Resnati M, Blasi F. Structure and function of the urokinase receptor. *Thromb Haemost* 1999;82 Suppl 1:19-22.
49. de Bock CE, Wang Y. Clinical significance of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) expression in cancer. *Med Res Rev* 2004;24(1):13-39.
50. Sidenius N, Blasi F. The urokinase plasminogen activator system in cancer: recent advances and implication for prognosis and therapy. *Cancer Metastasis Rev* 2003;22(2-3):205-22.

51. Kanse SM, Chavakis T, Al-Fakhri N, Hersemeyer K, Monard D, Preissner KT. Reciprocal regulation of urokinase receptor (CD87)-mediated cell adhesion by plasminogen activator inhibitor-1 and protease nexin-1. *J Cell Sci* 2004;117(Pt 3):477-85.
52. Tarui T, Andronicos N, Czekay RP, et al. Critical role of integrin alpha 5 beta 1 in urokinase (uPA)/urokinase receptor (uPAR, CD87) signaling. *J Biol Chem* 2003;278(32):29863-72.
53. Lee KH, Choi EY, Hyun MS, Kim JR. Involvement of MAPK pathway in hypoxia-induced up-regulation of urokinase plasminogen activator receptor in a human prostatic cancer cell line, PC3MLN4. *Exp Mol Med* 2004;36(1):57-64.
54. Wei Y, Yang X, Liu Q, Wilkins JA, Chapman HA. A role for caveolin and the urokinase receptor in integrin-mediated adhesion and signaling. *J Cell Biol* 1999;144(6):1285-94.
55. Simon DI, Wei Y, Zhang L, et al. Identification of a urokinase receptor-integrin interaction site. Promiscuous regulator of integrin function. *J Biol Chem* 2000;275(14):10228-34.
56. Wei Y, Waltz DA, Rao N, Drummond RJ, Rosenberg S, Chapman HA. Identification of the urokinase receptor as an adhesion receptor for vitronectin. *J Biol Chem* 1994;269(51):32380-8.
57. Kanse SM, Chavakis T, Kuo A, Bdeir K, Cines DB, Preissner KT. Variability in the expression of urokinase receptor (CD87) mutants on cells: relevance to cell adhesion. *Cell Biochem Funct* 2004;22(4):257-64.
58. Chavakis T, Kanse SM, May AE, Preissner KT. Haemostatic factors occupy new territory: the role of the urokinase receptor system and kininogen in inflammation. *Biochem Soc Trans* 2002;30(2):168-73.
59. van Aken BE, Seiffert D, Thinnis T, Loskutoff DJ. Localization of vitronectin in the normal and atherosclerotic human vessel wall. *Histochem Cell Biol* 1997;107(4):313-20.
60. Colman RW, Pixley RA, Najamunnisa S, et al. Binding of high molecular weight kininogen to human endothelial cells is mediated via a site within domains 2 and 3 of the urokinase receptor. *J Clin Invest* 1997;100(6):1481-7.
61. Higazi AA, Upson RH, Cohen RL, et al. Interaction of single-chain urokinase with its receptor induces the appearance and disappearance of binding epitopes within the resultant complex for other cell surface proteins. *Blood* 1996;88(2):542-51.

62. Czekay RP, Kuemmel TA, Orlando RA, Farquhar MG. Direct binding of occupied urokinase receptor (uPAR) to LDL receptor-related protein is required for endocytosis of uPAR and regulation of cell surface urokinase activity. *Mol Biol Cell* 2001;12(5):1467-79.
63. Behrendt N, Jensen ON, Engelholm LH, Mortz E, Mann M, Dano K. A urokinase receptor-associated protein with specific collagen binding properties. *J Biol Chem* 2000;275(3):1993-2002.
64. Nykjaer A, Christensen EI, Vorum H, et al. Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor targets the urokinase receptor to lysosomes via a novel binding interaction. *J Cell Biol* 1998;141(3):815-28.
65. Maupas-Schwalm F, Auge N, Robinet C, et al. The sphingomyelin/ceramide pathway is involved in ERK1/2 phosphorylation, cell proliferation, and uPAR overexpression induced by tissue-type plasminogen activator. *Faseb J* 2004;18(12):1398-400.
66. Dear AE, Medcalf RL. The urokinase-type-plasminogen-activator receptor (CD87) is a pleiotropic molecule. *Eur J Biochem* 1998;252(2):185-93.
67. Bohuslav J, Horejsi V, Hansmann C, et al. Urokinase plasminogen activator receptor, beta 2-integrins, and Src-kinases within a single receptor complex of human monocytes. *J Exp Med* 1995;181(4):1381-90.
68. Schlaepfer DD, Mitra SK. Multiple connections link FAK to cell motility and invasion. *Curr Opin Genet Dev* 2004;14(1):92-101.
69. Wozniak MA, Modzelewska K, Kwong L, Keely PJ. Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim Biophys Acta* 2004;1692(2-3):103-19.
70. Koshelnick Y, Ehart M, Hufnagl P, Heinrich PC, Binder BR. Urokinase receptor is associated with the components of the JAK1/STAT1 signaling pathway and leads to activation of this pathway upon receptor clustering in the human kidney epithelial tumor cell line TCL-598. *J Biol Chem* 1997;272(45):28563-7.
71. Carlin SM, Resink TJ, Tamm M, Roth M. Urokinase signal transduction and its role in cell migration. *Faseb J* 2005;19(2):195-202.
72. Dumler I, Weis A, Mayboroda OA, et al. The Jak/Stat pathway and urokinase receptor signaling in human aortic vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1998;273(1):315-21.
73. Nguyen DH, Catling AD, Webb DJ, et al. Myosin light chain kinase functions downstream of Ras/ERK to promote migration of urokinase-type plasminogen activator-stimulated cells in an integrin-selective manner. *J Cell Biol* 1999;146(1):149-64.

74. Takahashi K, Ikeo K, Gojobori T, Tanifuji M. Local function of urokinase receptor at the adhesion contact sites of a metastatic tumor cell. *Thromb Res Suppl* 1990;10:55-61.
75. Tang H, Kerins DM, Hao Q, Inagami T, Vaughan DE. The urokinase-type plasminogen activator receptor mediates tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and activation of mitogen-activated protein kinase in cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 1998;273(29):18268-72.
76. Richieri GV, Anel A, Kleinfeld AM. Interactions of long-chain fatty acids and albumin: determination of free fatty acid levels using the fluorescent probe ADIFAB. *Biochemistry* 1993;32(29):7574-80.
77. Brun T, Assimacopoulos-Jeannet F, Corkey BE, Prentki M. Long-chain fatty acids inhibit acetyl-CoA carboxylase gene expression in the pancreatic beta-cell line INS-1. *Diabetes* 1997;46(3):393-400.
78. Morrison C, Gannon F. The impact of the PCR plateau phase on quantitative PCR. *Biochim Biophys Acta* 1994;1219(2):493-8.
79. Stoscheck CM. Increased uniformity in the response of the coomassie blue G protein assay to different proteins. *Anal Biochem* 1990;184(1):111-6.
80. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
81. Yki-Jarvinen H. Thiazolidinediones. *N Engl J Med* 2004;351(11):1106-18.
82. Way KJ, Chou E, King GL. Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches. *Trends Pharmacol Sci* 2000;21(5):181-7.
83. Warrior U, Chiou XG, Sheets MP, et al. Development of a p38 Kinase Binding Assay for High Throughput Screening. *J Biomol Screen* 1999;4(3):129-35.
84. Fox T, Coll JT, Xie X, et al. A single amino acid substitution makes ERK2 susceptible to pyridinyl imidazole inhibitors of p38 MAP kinase. *Protein Sci* 1998;7(11):2249-55.
85. Watt MJ, Southgate RJ, Holmes AG, Febbraio MA. Suppression of plasma free fatty acids upregulates peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and delta and PPAR coactivator 1alpha in human skeletal muscle, but not lipid regulatory genes. *J Mol Endocrinol* 2004;33(2):533-44.
86. Leonhardt M, Langhans W. Fatty acid oxidation and control of food intake. *Physiol Behav* 2004;83(4):645-51.

87. Moller DE, Kaufman KD. Metabolic syndrome: a clinical and molecular perspective. *Annu Rev Med* 2005;56:45-62.
88. Carluccio MA, Massaro M, Bonfrate C, et al. Oleic acid inhibits endothelial activation: A direct vascular antiatherogenic mechanism of a nutritional component in the mediterranean diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19(2):220-8.
89. Munday JS, Thompson KG, James KA. Dietary conjugated linoleic acids promote fatty streak formation in the C57BL/6 mouse atherosclerosis model. *Br J Nutr* 1999;81(3):251-5.
90. Reissig D, Rassoul F, Salvetter J, Wagner O, Richter V. Effect of fatty acids on expression of endothelial leukocyte adhesion molecules. *Eur J Nutr* 2003;42(4):224-7.
91. May AE, Kanse SM, Lund LR, Gisler RH, Imhof BA, Preissner KT. Urokinase receptor (CD87) regulates leukocyte recruitment via beta 2 integrins in vivo. *J Exp Med* 1998;188(6):1029-37.
92. Gyetko MR, Sud S, Kendall T, Fuller JA, Newstead MW, Standiford TJ. Urokinase receptor-deficient mice have impaired neutrophil recruitment in response to pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Immunol* 2000;165(3):1513-9.
93. May AE, Schmidt R, Kanse SM, et al. Urokinase receptor surface expression regulates monocyte adhesion in acute myocardial infarction. *Blood* 2002;100(10):3611-7.
94. Gu JM, Johns A, Morser J, Dole WP, Greaves DR, Deng GG. Urokinase plasminogen activator receptor promotes macrophage infiltration into the vascular wall of ApoE deficient mice. *J Cell Physiol* 2005;204(1):73-82.
95. Tripathy D, Mohanty P, Dhindsa S, et al. Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects. *Diabetes* 2003;52(12):2882-7.
96. Kim MH, Cho HS, Jung M, et al. Extracellular signal-regulated kinase and AP-1 pathways are involved in reactive oxygen species-induced urokinase plasminogen activator receptor expression in human gastric cancer cells. *Int J Oncol* 2005;26(6):1669-74.
97. Toborek M, Lee YW, Garrido R, Kaiser S, Hennig B. Unsaturated fatty acids selectively induce an inflammatory environment in human endothelial cells. *Am J Clin Nutr* 2002;75(1):119-25.
98. Mu YM, Yanase T, Nishi Y, et al. Saturated FFAs, palmitic acid and stearic acid, induce apoptosis in human granulosa cells. *Endocrinology* 2001;142(8):3590-7.

99. Richieri GV, Kleinfeld AM. Unbound free fatty acid levels in human serum. *J Lipid Res* 1995;36(2):229-40.
100. Picone R, Kajtaniak EL, Nielsen LS, et al. Regulation of urokinase receptors in monocytelike U937 cells by phorbol ester phorbol myristate acetate. *J Cell Biol* 1989;108(2):693-702.
101. Lund LR, Ronne E, Roldan AL, et al. Urokinase receptor mRNA level and gene transcription are strongly and rapidly increased by phorbol myristate acetate in human monocyte-like U937 cells. *J Biol Chem* 1991;266(8):5177-81.
102. Ostrowski SR, Plomgaard P, Fischer CP, et al. Interleukin-6 infusion during human endotoxaemia inhibits in vitro release of the urokinase receptor from peripheral blood mononuclear cells. *Scand J Immunol* 2005;61(2):197-206.
103. Pegorier JP, Le May C, Girard J. Control of gene expression by fatty acids. *J Nutr* 2004;134(9):2444S-9S.
104. Verges B. Clinical interest of PPARs ligands. *Diabetes Metab* 2004;30(1):7-12.
105. Neve BP, Fruchart JC, Staels B. Role of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in atherosclerosis. *Biochem Pharmacol* 2000;60(8):1245-50.
106. Djouadi F, Weinheimer CJ, Saffitz JE, et al. A gender-related defect in lipid metabolism and glucose homeostasis in peroxisome proliferator- activated receptor alpha- deficient mice. *J Clin Invest* 1998;102(6):1083-91.
107. Yoshikawa H, Tajiri Y, Sako Y, Hashimoto T, Umeda F, Nawata H. Effects of free fatty acids on beta-cell functions: a possible involvement of peroxisome proliferator-activated receptors alpha or pancreatic/duodenal homeobox. *Metabolism* 2001;50(5):613-8.
108. Haffner SM, Greenberg AS, Weston WM, Chen H, Williams K, Freed MI. Effect of rosiglitazone treatment on nontraditional markers of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 2002;106(6):679-84.
109. Yki-Jarvinen H, Sutinen J, Silveira A, et al. Regulation of plasma PAI-1 concentrations in HAART-associated lipodystrophy during rosiglitazone therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(4):688-94.
110. Marx N, Froehlich J, Siam L, et al. Antidiabetic PPAR gamma-activator rosiglitazone reduces MMP-9 serum levels in type 2 diabetic patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(2):283-8.
111. van Wijk JP, Rabelink TJ. Impact of thiazolidinedione therapy on atherogenesis. *Curr Atheroscler Rep* 2005;7(5):369-74.

112. Singh N, Webb R, Adams R, et al. The PPAR-gamma activator, Rosiglitazone, inhibits actin polymerisation in monocytes: involvement of Akt and intracellular calcium. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;333(2):455-62.
113. Rask-Madsen C, King GL. Proatherosclerotic mechanisms involving protein kinase C in diabetes and insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(3):487-96.
114. Boden G, Carnell LH. Nutritional effects of fat on carbohydrate metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2003;17(3):399-410.
115. Yu J, Bian D, Mahanivong C, Cheng RK, Zhou W, Huang S. p38 Mitogen-activated protein kinase regulation of endothelial cell migration depends on urokinase plasminogen activator expression. *J Biol Chem* 2004;279(48):50446-54.
116. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 2002;23(5):599-622.