

Aus der Klinik für Innere Medizin / Kardiologie des Deutschen
Herzzentrums Berlin
Stiftung des bürgerlichen Rechts

DISSERTATION

Regulation von Matrix Metalloproteinase-9 durch Insulin in
humanen THP-1 Monozyten

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Arne Fiscoeder

aus Berlin

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. P. Stawowy
2. Prof. Dr. med. U. Kintscher
3. Priv.-Doz. Dr. med. R. Dechend

Datum der Promotion: 20. November 2009

Teile dieser Dissertationsschrift wurden in folgenden Arbeiten publiziert:

Publikation:

Arne Fiscoeder, Heike Meyborg, Dietger Stibenz, Eckart Fleck, Kristof Graf, Philipp Stawowy. Insulin augments matrix metalloproteinase-9 expression in monocytes. *Cardiovasc Res.* 2006; 73(4): 841-848.

Abstract:

Philipp Stawowy, Heike Meyborg, Arne Fiscoeder, Michael Gräfe, Kristof Graf, Eckart Fleck. Regulation von Matrix Metalloproteinasen in Monozyten durch Insulin. *Clin Res Cardiol.* 2006; 95(Suppl 5): P115.

1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	6
2. EINLEITUNG.....	8
2.1. INSULINRESISTENZ: RISIKOFAKTOR DER ATHEROSKLEROSE.....	8
2.2. MATRIX METALLOPROTEINASEN (MMPs).....	15
2.3. FRAGESTELLUNG	20
3. MATERIAL UND METHODEN.....	21
3.1. CHEMISCHE SUBSTANZEN.....	21
3.2. ANTIKÖRPER	23
3.3. GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN	24
3.4. ZELLKULTUR.....	25
3.5. PROTEINEXTRAKTION UND PROTEINBESTIMMUNG	27
3.6. GEWINNUNG VON ZELLFREIEM ÜBERSTAND FÜR DIE GELATIN-ZYMOGRAPHIE.....	28
3.7. SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE.....	29
3.8. GELATIN-ZYMOGRAPHIE	30
3.9. WESTERN BLOT.....	32
3.10. CHARAKTERISIERUNG VON OBERFLÄCHENMERKMALEN DURCH FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTING (FACS)	34
3.11. DATENANALYSEN	35
4. ERGEBNISSE.....	37
4.1. INSULIN INDUZIERT MMP-9 IN HUMANEN THP-1 MONOZYTEN.....	37
4.2. INSULIN INDUZIERTES MMP-9 IST DURCH APMA AKTIVIERBAR	39
4.3. ZEIT- UND KONZENTRATIONSABHÄNGIGKEIT VON INSULIN UND MMP-9.....	41
4.4. DIE BEDEUTUNG DES INSULINREZEPTORS BEI DER MMP-9 INDUKTION DURCH INSULIN IN THP-1 MONOZYTEN	47
4.5. INSULIN INDUZIERT MMP-9 DURCH DIE AKTIVIERUNG DER MITOGENEN SIGNALTRANSDUKTIONSKASKADE.....	60
4.6. INSULIN INDUZIERT MMP-9 IN THP-1 MONOZYTEN DURCH TRANSLATIONALE UND TRANSKRIPTIONELLE MECHANISMEN.....	71
5. DISKUSSION	74
6. ZUSAMMENFASSUNG	89

7. LITERATURVERZEICHNIS	91
8. DANKSAGUNG	99
9. LEBENSLAUF	100
10. ERKLÄRUNG.....	100

1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Akt	Proteinkinase B
Ang II	Angiotensin II
APMA	4-Aminophenylmercuriumacetat
BSA	Bovines Serum Albumin
dec-CMK	decanoyl-RVKR-chloromethylketone
eNOs	endotheliale Nitridoxidsynthetase
DMSO	Dimethylsulfoxid
ERK 1/2	extrazelluläre signal regulated Kinase 1/2
EZM	extrazelluläre Matrix
EZR	extrazellulärer Raum
FACS	Fluorescence Activating Cell Sorter
FFA	freie Fettsäuren
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
Grb2	Growth-factor receptor binding protein 2
GLUT-4	Glukosetransportmolekül-4
GSK-3	Glykogensynthasekinase 3
HCL	Salzsäure
HDL	High-Density-Lipoprotein
IDF	International Diabetes Federation

IGF-1	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-1
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
kDa	Kilodalton
LDL	low-density-lipoproteins
MCP-1	monocyte chemotactic protein 1
MAPK	Mitogen-activated-protein-kinase
MEK (MAPKK)	Mitogen-activated-protein-kinase-kinase
MMP	Matrix Metalloproteinase
MT-MMP	membrangebundene Matrix Metalloproteinase
PAI	Plasminogen Aktivator Inhibitor
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PI3-K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PMSF	Phenyl-Methanesulfonyl Floride
PPAR	Peroxisome proliferator activated receptor
PTCA	perkutane transluminale Koronarangioplastie
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sos	son of sevenless
TBS	Tris-buffered saline
TGN	<i>trans</i> -Golgi Netzwerk
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinases
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
UKPDS	UK Prospective Diabetes Study
VSMC	glatte Gefäßmuskelzelle
WHO	World Health Organization

2. Einleitung

2.1. Insulinresistenz: Risikofaktor der Atherosklerose

Ein Hauptgrund für die frühzeitige und gesteigert auftretende kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität sind Risikofaktoren wie abdominelle Adipositas, arterielle Hypertonie, Dyslipidämie sowie Hyperinsulinämie und Insulinresistenz (ADA 1999). Diese Risikofaktoren wurden durch epidemiologische Studien, wie die Framingham-Heart-Studie identifiziert und werden nach der International Diabetes Federation (IDF) zusammen als „metabolischen Syndrom“ definiert (siehe Abb. 1).

<u>Definition des metabolischen Syndroms:</u>
<ul style="list-style-type: none"> • <u>Abdominelle Adipositas</u> mit einem Taillenumfang ≥ 94 cm (♂) bzw. ≥ 80 cm (♀) bei Europäern (andere ethnische Gruppen haben andere Grenzwerte) • <u>plus 2 der weiteren 4 folgenden Faktoren:</u>
- Triglyzeride > 150 mg/dL (1,7 mmol/L) *
- HDL-Cholesterin < 50 mg/dL (1,3 mmol/L) * ♀ < 40 mg/dL (1,0 mmol/L) * ♂
- Blutdruck $> 130/85$ mmHg *
- Nüchtern-Plasmaglukose > 100 mg/dL (5,6 mmol/L) oder Diabetes mellitus Typ 2
* oder vorausgegangene Therapie der Störung

Abbildung 1: Definition des metabolischen Syndroms (IDF, 2005)

Insulinresistenz als Leitsymptom des metabolischen Syndroms und die damit verbundene kompensierende Hyperinsulinämie können zu endothelialer Dysfunktion, Fettstoffwechselstörungen, Bluthochdruck und vaskulärer Inflammation führen und die Initiierung und Progression von kardiovaskulären Erkrankungen fördern (Reaven 1995; DeFronzo 1997; Nigro, Osman et al. 2006). Bei der Entwicklung der

Insulinresistenz stellt sich die viszerale Adipositas als entscheidender Faktor dar, welche in den vergangenen 30 Jahren weltweit stark zugenommen hat (Lyon, Law et al. 2003). Ein Grund hierfür ist die entstandene Fastfoodgesellschaft (Isganaitis and Lustig 2005). Selbst Kinder und Jugendliche zeigen in immer früheren Lebensjahren eine bestehende Adipositas. In einer deutschlandweit repräsentativen Studie vom Robert Koch-Institut (RKI) an Kindern und Jugendlichen im Alter von 3 bis 17 im Zeitraum 2003-2006 zeigen sich 15 % als übergewichtig oder adipös. Vergleichende Referenzdaten aus den Jahren 1985-1999 zeigen, dass sich der Anteil der übergewichtigen Kinder um 50 % gesteigert hat und der Anteil der adipösen Kinder und Jugendlichen sogar verdoppelt hat. Hier zeichnete sich neben den Ursachen der Ernährung, mangelnden Bewegung und eine genetische Komponente ab (RKI 2006).

Diese Explosion der Adipositas führt zu einem Anstieg der Prävalenz der Insulinresistenz, des metabolischen Syndroms und Diabetes mellitus Typ 2 und es ist vorauszusehen, dass das von einem Anstieg vorzeitiger kardiovaskulärer Komplikationen gefolgt sein wird (Pyorala, Miettinen et al. 2000).

Fettgewebe gilt heute als endokrines Organ, welches diverse proinflammatorische Faktoren sezerniert und systemische und vaskuläre Effekte auslösen kann (Lyon, Law et al. 2003). Zusammengenommen, bezeichnet man solche proinflammatorischen Faktoren als Adipokine. Zu ihnen zählen: TNF- α , Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 (PAI-1), IL-6, Resistin und Leptin (Lyon, Law et al. 2003). Ein weiterer Faktor ist die Sekretion von freien Fettsäuren aus Fettgewebe. Studien zeigen, dass diese Faktoren zur Entwicklung von Atherosklerose, Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2 beitragen (Lyon, Law et al. 2003; Eckel, Grundy et al. 2005).

Der Diabetes mellitus Typ 2 ist definiert als eine durch den Leitbefund der chronischen Hyperglykämie charakterisierte Stoffwechselstörung. Hierbei erstreckt sich die pathophysiologische Spannbreite bei den meist übergewichtigen Patienten von einer vorwiegenden Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel bis zu einem vorwiegend sekretorischen Defekt mit Insulinresistenz (ADA 1999).

Unter Insulinresistenz versteht man die Unfähigkeit von peripheren Zellen auf den Stimulus von Insulin am Insulinrezeptor zu reagieren und Glukose zu verwerten. Die Nichtaufnahme von Glukose in das Zellinnere ruft kompensatorisch eine verstärkte sekretorische Antwort der β -Zellen des Pankreas hervor, was zu einer chronischen

Hyperinsulinämie führt (Reaven 1995). Da ein Defekt der β -Zelle des Pankreas zunächst nicht besteht, kann der Körper die verminderte Glukoseaufnahme mit vermehrter Insulinausschüttung kompensieren. Auf Grund eines progredienten Verlustes der β -Zellen, reicht die Insulinsekretion in einer späteren Phase nicht mehr aus den Blutglukosespiegel in Norm zu halten (siehe Abb. 2) (Festa, Williams et al. 2006). Wenigstens 4 bis 7 Jahre, wahrscheinlich Jahrzehnte später nach einem chronischen Zustand der Hyperinsulinämie manifestiert sich die diabetische Stoffwechselstörung, oft zusammen mit schon deutlich fortgeschrittener Atherosklerose (Harris, Klein et al. 1992).

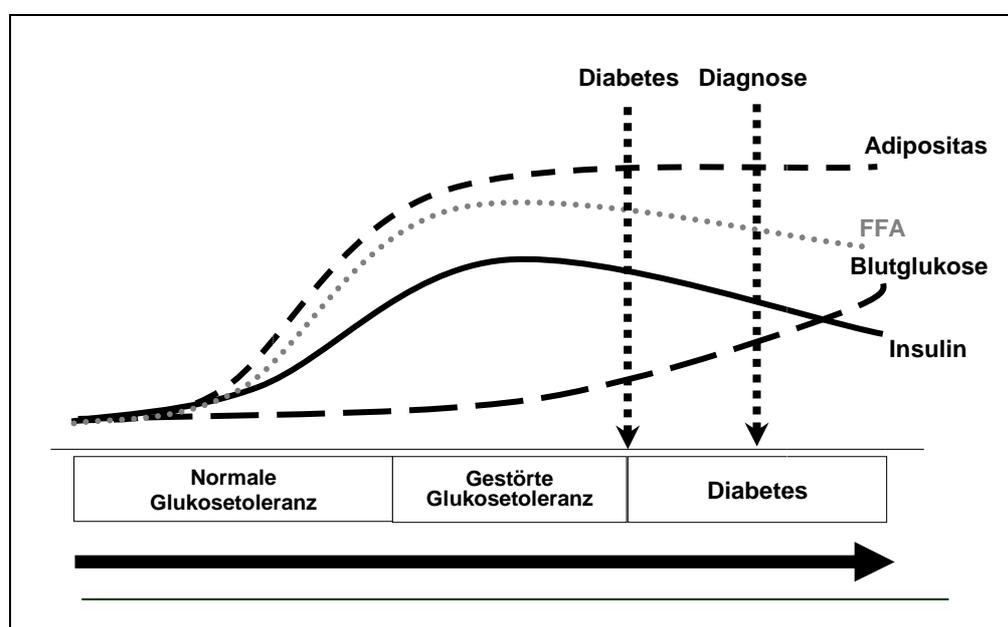


Abbildung 2: Entwicklung des Typ 2 Diabetes über die Insulinresistenz in Anlehnung an Festa et al. (Festa, Williams et al. 2006); FFA: freie Fettsäuren.

Der Grund für die erhöht auftretende Atherosklerose im prädiabetischen Status, d.h. bevor es zu einer chronischen Hyperglykämie im Rahmen des manifesten Diabetes mellitus Typ 2 kommt, ist unklar. Natürlich handelt es sich beim metabolische Syndrom auch um einen proinflammatorischen und prothrombotischen Zustand, begleitet von erhöhten proinflammatorischen Mediatoren, wie C-reaktivem Protein (CRP), Interleukin-6 (IL-6) und Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 (PAI-1), die zur Entwicklung der Atherosklerose beitragen (Festa, Hanley et al. 2003). Obwohl beides, Insulinresistenz und verminderte Insulinsekretion die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 voraussagen, ist jedoch nicht geklärt, ob die gesteigerte

Atherosklerose im prädiabetischen Zustand primär durch eine erhöhte Insulinresistenz mit Hyperinsulinämie oder durch eine verringerte Insulinsekretion entsteht. Die Wahrscheinlichkeit für erstgenanntes liegt auf Grund der im Rahmen des metabolischen Syndroms entwickelten Risikofaktoren nahe (Haffner, Mykkanen et al. 2000).

Die Insulinresistenz ist durch einen Post-Rezeptordefekt des Insulinrezeptor gekennzeichnet. Der Insulinrezeptor ist ein transmembranöses, heterodimeres, integrales Membranprotein, dessen vier Untereinheiten (zwei α - und zwei β -Untereinheiten) durch Disulfidbrücken verbunden sind. Über die Bindung eines Insulinmoleküls vermittelt er pleiotrope Effekte, vorwiegend über zwei mögliche Signaltransduktionskaskaden, die beide durch Insulinrezeptorsubstrate (IRS) initiiert werden, wobei intrinsische Rezeptortyrosinkinasen phosphoryliert werden (Bevan 2001). Man unterscheidet so den „metabolischen“ (PI3-Kinase)- vom „mitogenen“ (MAPK)-Signaltransduktionweg (siehe Abb. 3.A).

Insulin selbst zeigt sowohl atherosklerotische als auch antiatherosklerotische Effekte (siehe Abb. 3.B) (Nigro, Osman et al. 2006). Protektive Effekte, die über den metabolischen Signaltransduktionsweg vermittelt werden, sind im Rahmen des Insulinresistenzsyndroms abgeschwächt oder sogar aufgehoben. Der Verlust dieser protektiven Effekte, kombiniert mit potentiell atherosklerotischen Effekten, die über die noch intakte mitogene Signaltransduktionskaskade vermittelt werden, scheint jedoch zu einem proinflammatorischen Status zu führen und damit zu einer Progression der atherosklerotischen Prozesse beizutragen (Schwartz and Reaven 2006).

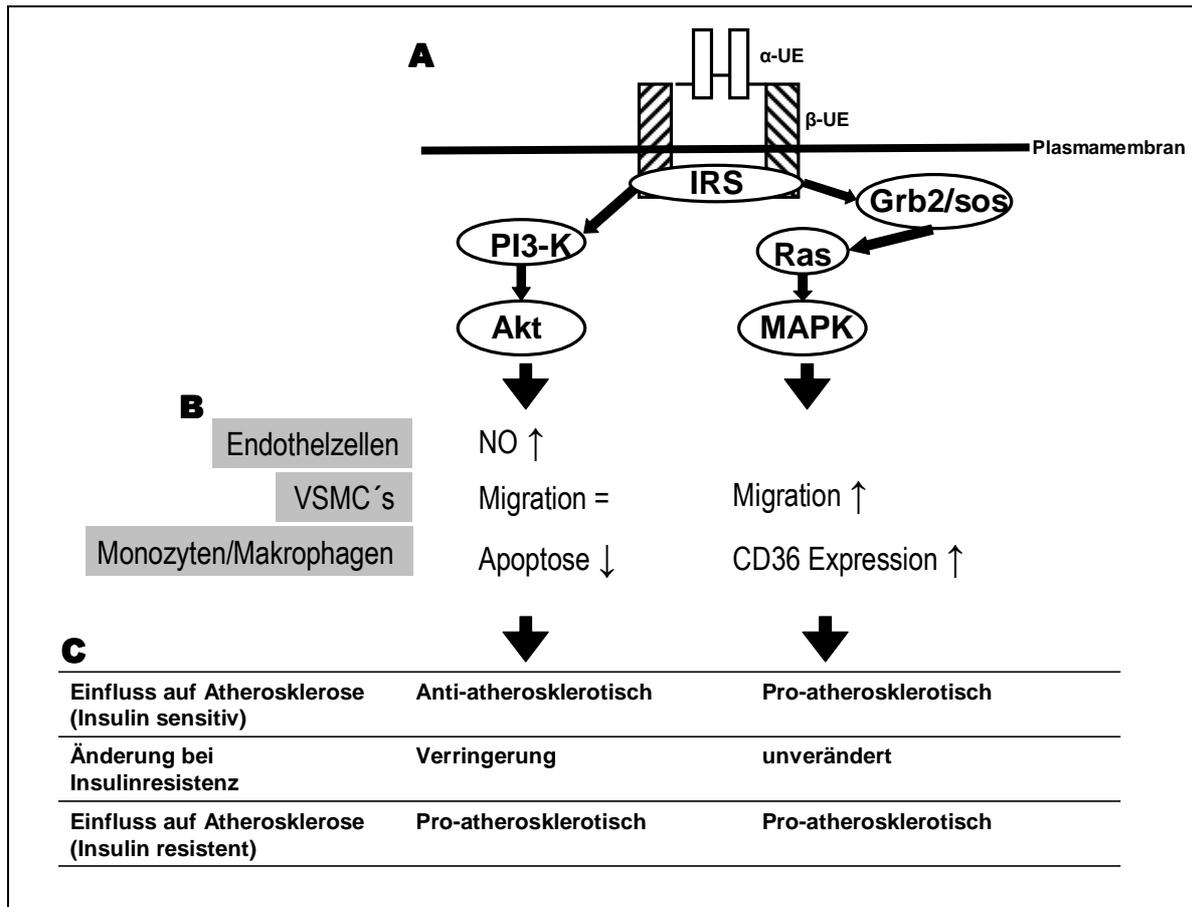


Abbildung 3. A: Schematische Darstellung der metabolischen und mitogenen Signaltransduktionskaskade des Insulinrezeptors vermittelt über die PI3-Kinase (PI3-K) bzw. MAP-Kinase (MAPK). **3. B:** Ansatzpunkte in vaskulären Zellen für Interaktionen zwischen beiden insulinigen Signaltransduktionswegen und Atherosklerose. **3. C:** Vergleich der atherosklerotischen Effekte im insulinresistenten und -sensitiven Zustand in Unterscheidung der metabolischen und mitogenen Signaltransduktionskaskade. Abbildung in Anlehnung an Bevan und Nigro et al. (Bevan 2001; Nigro, Osman et al. 2006).

In der metabolischen Signaltransduktionskaskade bindet die PI3-Kinase mit ihrer regulatorischen Untereinheit (p85) an den IRS und aktiviert die katalytische Untereinheit (p110), die zur Phosphorylierung des Inositolrings der PI3-Kinase führt. Die aktivierte Form der PI3-Kinase phosphoryliert die Proteinkinase B (Akt), die in metabolischem Gewebe zu einer anschließenden Translokation von GLUT-4-Transportern an die Zellmembran (Thong, Dugani et al. 2005) sowie über die Inaktivierung der Glykogensynthetasekinase-3 (GSK-3) zur Glykogensynthese führt

(Fang, Yu et al. 2000). In vaskulären Endothelzellen aktiviert die PI3-Kinase die endotheliale Nitridoxidsynthetase (eNOs), die Vasodilation fördert sowie Inflammation, Plättchenaggregation und die Proliferation von glatten Muskelzellen hemmt (Hsueh and Quinones 2003).

Neben der Aktivierung der PI3-Kinase kann das Insulinsignal auf der Ebene der IRS zum mitogenen Signaltransduktionsweg divergieren. Dieser wird über die Signalproteine Growth-factor receptor binding protein 2 (Grb2), son of sevenless (sos) und folgende kleine G-Proteine (ras) hin zur Mitogen-activated-protein-Kinase (MAPK) Kaskade geleitet, die insulinabhängige Genregulationen und mitogene Effekte vermittelt, wie z.B. verstärkte Proliferation, PAI-1 Produktion und gesteigertes Zellwachstum (Hsueh and Law 1999).

Insulinresistenz ist gekennzeichnet durch eine Dysregulation in der metabolische PI3-Kinase Signaltransduktionskaskade, wobei die mitogene MAPK Signaltransduktionskaskade intakt bleibt (siehe Abb. 3.C) und damit ein überwiegend pro-atherosklerotischer Zustand erreicht wird (Jiang, Lin et al. 1999; Cusi, Maezono et al. 2000; Jonas, Edelman et al. 2005). Somit könnte eine bestehende Hyperinsulinämie im Rahmen der Insulinresistenz die MAPK vermehrt und uneingeschränkt aktivieren, welches die Progression der Atherosklerose fördert.

Atherosklerose ist eine chronisch inflammatorische Erkrankung, die aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten und weiteren Blutbestandteilen sowie fibrinösem Gewebe und Kalzium bestehen. Die begleitende Entzündungsreaktion, geprägt durch mononukleäre Zellen (Monozyten/Makrophagen), spielt eine zentrale Rolle in der Initiierung und Progression sowie bei auftretenden Komplikationen von atherosklerotischen Läsionen (Libby 2006).

In der Pathogenese der atherosklerotischen Läsion kommt es initial zu einer endothelialen Dysfunktion, die durch eine erhöhte Permeabilität für Lipoproteine des Endothels charakterisiert ist. Somit wird das Übertreten von Lipoproteinen aus den Gefäßen in das intimale Bindegewebe und die Bildung von „fatty streaks“ ermöglicht (Ross 1999).

Oxidierete Lipoproteine zusammen mit inflammatorischen Zytokinen steigern die Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen auf kardiovaskulären

Endothelzellen (Khan, Parthasarathy et al. 1995). In der folgenden Phase werden diese endothelialen Adhäsionsmoleküle von Integrinen, die auf zirkulierende Monozyten exprimiert werden, erkannt. Die Monozyten rollen entlang des Endothels und verringern dadurch ihre Flussgeschwindigkeit. Die noch instabile Monozyten-Endothel-Interaktion wird durch weitere Aktivierung der Monozyten durch Chemokine in einen stabilen Zellkontakt überführt, so dass die Monozyten adhären. Folgend transmigrieren die Monozyten durch die endotheliale Barriere in den subendothelialen Teil der Intima (Ross 1999). Weitere Chemokine, wie Osteopontin und MCP-1, die in atherosklerotischen Läsionen überexprimiert sind, lenken monozytäre Zellen zur endothelialen Läsion (Ikeda, Shirasawa et al. 1993; Wilcox, Nelken et al. 1994; Gosling, Slaymaker et al. 1999; Bruemmer, Collins et al. 2003). Die monozytäre Diapedese benötigt die Aktivität proteolytischer Enzyme, wie die der Familie der Matrix Metalloproteinasen (MMPs), um die Basalmembran und die extrazelluläre Matrix zu überwinden (Galis, Sukhova et al. 1995; Matias-Roman, Galvez et al. 2005). Nach der Extravasation proliferieren die monozytären Zellen und differenzieren zu Makrophagen. Diese exprimieren den so genannten Scavenger-Rezeptor (CD36), an den oxidierte Lipoproteine binden können. Die Makrophagen werden zu endozytotischen, lipidspeichernden Schaumzellen (Guyton and Klemp 1996). Die vermehrt gebildeten Schaumzellen akkumulieren im subendothelialen Raum. Sie können die endozytierten Fettvakuolen nicht lysieren und eliminieren, was zum Untergang einzelner Makrophagen und zur Ablagerung von extrazellulären Lipiden im intimalen Bindegewebe führt. Durch die ungehemmte Bildung von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren entsteht ein sich selbst unterhaltender Kreislauf aus einer verstärkten Rekrutierung und Akkumulation mononukleärer Entzündungszellen. Unter der Beteiligung von Integrinen und MMPs trägt die Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen sowie deren gesteigerte Synthese und Ablagerung von extrazellulärer Matrix zum Wachstum der atherosklerotischen Läsion bei, die schließlich zur Bildung einer fibrösen Kappe über einem Kern aus Lipiden und nekrotischem Gewebe führt (Kanda, Kuzuya et al. 2000; Dzau, Braun-Dullaes et al. 2002).

Unter dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine werden von eingewanderten monozytären Entzündungszellen in der Läsion MMPs gebildet, die durch Proteolyse die fibröse Plaque schwächen und so zur Ruptur der nun instabilen Plaque

beitragen können (Galis, Sukhova et al. 1994; Shah 1998). Die vulnerablen, rupturgefährdeten atherosklerotischen Läsionen zeichnen sich somit durch eine verhältnismäßig verringerte extrazelluläre Matrix, einer relativen Erhöhung der Infiltration von inflammatorischen Zellen zu verringerten glatten Muskelzellen und einer erhöhten adventitiellen und intimalen Neovaskularisation aus (Cipollone, Fazia et al. 2005). Bei Ruptur solch einer fibrösen Kappe wird thrombogenes Material frei. Der Kontakt mit den Faktoren des endogenen Gerinnungssystems initiiert die Gerinnungskaskade und führt damit zur Formation von Thromben, die das Lumen okkludieren und klinisch im akuten Herzinfarkt enden. Ungefähr 70 % akut ischämischer Syndrome sind auf die Plaqueruptur zurückzuführen (Falk, Shah et al. 1995; Virmani, Kolodgie et al. 2000).

2.2. Matrix Metalloproteinasen (MMPs)

Die Progression von atherosklerotischen Plaqueläsionen bis hin zur Plaqueruptur erfordert die Familie der MMPs, die hauptsächlich von inflammatorischen Zellen synthetisiert werden (Galis, Sukhova et al. 1995; Jones, Sane et al. 2003; Cipollone, Fazia et al. 2005; Newby 2005). MMPs sind eine Familie von mehr als 23 verschiedenen beim Menschen identifizierten, zinkabhängigen und proteolytischen Enzymen (Nagase, Visse et al. 2006). Als Gruppe sind sie in der Lage alle Komponenten der extrazellulären Matrix zu degradieren (Galis, Sukhova et al. 1994; Van den Steen, Dubois et al. 2002; Lindstedt, Leskinen et al. 2004). Untersuchungen zeigen, dass MMPs eine essentielle Rolle bei verschiedenen physiologischen Prozessen spielen. So war die erste dokumentierte MMP eine Kollagenase, die im Schwanz einer Kaulquappe während deren Metamorphose zum Frosch nachzuweisen war (Gross and Lapiere 1962). Im Menschen sind MMPs z.B. in der Embryogenese (Vu and Werb 2000) und Angiogenese (Roy, Zhang et al. 2006) von Bedeutung, jedoch auch in pathologischen Prozessen, wie - neben der atherosklerotischen Plaqueruptur - in der Metastasierung von Tumoren (Deryugina and Quigley 2006) und bei Entzündungen und Arthritiden (Mohammed, Smookler et al. 2003).

MMPs können vereinfacht in zwei Gruppen unterteilt werden, wobei man die membrangebundenen MMPs (MT-MMP) von den frei gelösten MMPs unterscheidet.

MT-MMPs können nur perizellulär ihre Wirkung entfalten, hingegen frei gelöste MMPs in den extrazellulären Raum (EZR) sezerniert werden und somit potentiell überall proteolytisch aktiv sind (Nagase, Visse et al. 2006). Wegen ihrer proteolytischen Eigenschaften werden alle löslichen MMPs als enzymatisch inaktive oder zymogene Form (pro-MMP) synthetisiert, die einer anschließenden proteolytischen Aktivierung bedarf (Van den Steen, Dubois et al. 2002; Nagase, Visse et al. 2006). Die sezernierten zymogenen Proformen der frei gelösten MMPs werden durch verschiedenen Proteasen extrazellulär aktiviert, im Gegensatz zu den MT-MMPs, welche bereits intrazellulär aktiviert werden. Verschiedene MMPs können hierbei weitere MMPs aktivieren, wodurch eine Aktivierungskaskade entsteht. So können zum Beispiel MT-MMPs MMP-2 und MMP-13 aktivieren, welche beide nun MMP-9 aktivieren können (Van den Steen, Dubois et al. 2002). Zwei Hauptfamilien von Proteasen verflechten hier das Aktivierungsnetzwerk: zum einen das Plasminogenaktivator/ Plasmin-System und zum anderen die MT-MMPs, die selbst durch Furin intrazellulär aktiviert werden (Nagase, Visse et al. 2006). Furin ist eine Proprotein Convertase, die durch endoproteolytische Spaltung an dibasischen Aminosäuresequenzen Proproteine, wie pro-TGF- β 1 oder pro-MT1-MMPs, posttranslational aktiviert (Stawowy, Margeta et al. 2004).

Die Aktivität der MMPs wird unter physiologischen Bedingungen präzise auf der Ebene der Transkription, Zymogenaktivierung oder durch Interaktion mit den physiologischen MMP-Inhibitoren TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) reguliert (Brew, Dinakarandian et al. 2000; Nagase, Visse et al. 2006). TIMPs sind ca. 23 kDa große Proteine, die MMPs in einer stöchiometrischen Ratio von 1:1 inhibieren und so ihre lokale Aktivität im Gewebe kontrollieren. Vier natürlich vorkommende TIMPs (TIMP-1, -2, -3, -4) sind bisher bekannt, die jeweils limitierte Affinitäten zu bestimmten MMPs zeigen (Brew, Dinakarandian et al. 2000). Zudem besitzen sie auch aktivierende Eigenschaft auf frei gelöste MMPs durch die Bildung eines Komplexes mit MT-MMP. Zum Beispiel dient ein gebundenes TIMP-2 an MT-MMP als Rezeptor für pro-MMP-2, welche dann vollständig aktiviert wird (Strongin, Collier et al. 1995). Somit entscheidet das Verhältnis von MT-MMP, TIMP-2 und pro-MMP-2 über eine Aktivierung oder Inhibition.

MMP-9 (Gelatinase B) gehört zu der nicht membrangebundenen Gruppe der MMPs. Sie ist neben der MMP-2 (Gelatinase A) die zweite MMP die gelatinolytische

Eigenschaften besitzt. Die biochemische Struktur der Gelatinasen (Abb. 4) besteht aus einem Signalpeptid an der N-terminalen Region, welche die Enzymaufnahme in das endoplasmatische Retikulum und den Transport aus der Zelle ermöglicht. An das Signalpeptid grenzt die hydrophobe Propeptiddomäne, die die benachbarte katalytische Domäne abschirmt. Im katalytischen Zentrum sitzt ein Zn^{2+} -Ion (Van den Steen, Dubois et al. 2002). Die katalytische Domäne der Gelatinasen hat eine besondere Struktur im Vergleich zu anderen MMPs. Sie besitzt drei Fibronektindomänen, die Bindung und Proteolyse von Typ IV Kollagen sowie denaturiertem Kollagen ermöglichen (Morgunova, Tuuttila et al. 1999). Für die Aktivierung des pro-MMPs dissoziiert das Cysteinylsulphydryl in der Propeptiddomäne vom katalytischen Zn^{2+} -Ion. Dieser so genannte „Cystein-Switch-Mechanismus“ ist der gewöhnliche Aktivierungsmechanismus aller MMPs (Van Wart and Birkedal-Hansen 1990). Die C-terminale Hämpexindomäne ist mit dem katalytischen Zentrum über eine flexible Region (hinge Region) verbunden, die das Binden von anderen Proteinen ermöglicht, welche die MMP Aktivität verändern kann (Van den Steen, Dubois et al. 2002).

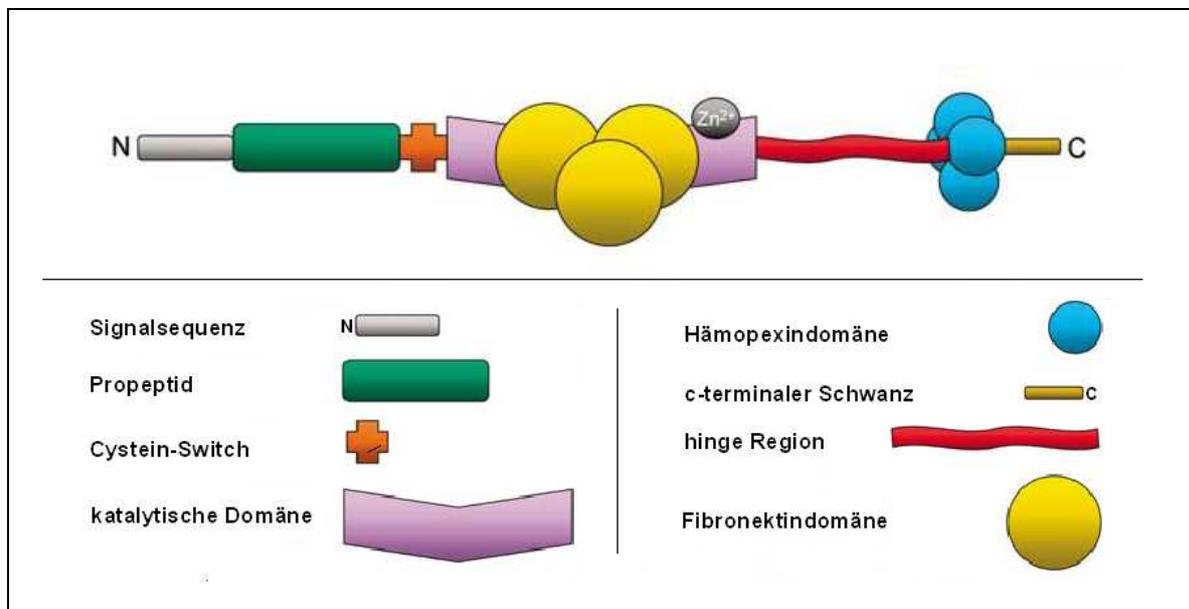


Abbildung 4: Schematische Darstellung der multidomänen Struktur der Gelatinasen. Dargestellt sind bei der N-terminalen Sequenz angefangen, das Propeptid, die Cystein-Switch-Einheit, die katalytische Domäne mit ihren drei Fibronektindomänen und dem gebundenen Zn^{2+} -Ion im katalytischen Zentrum, sowie die flexibel bewegliche hinge Region, die Hämpexindomäne und das C-terminale Ende (Chow, Cena et al. 2007).

Im Vergleich zu MMP-9 wird MMP-2 auf dem konstitutiven Weg sezerniert. MMP-9 wird hingegen erst auf die Stimulation durch proinflammatorische Zytokine vor allem von monozytären Zellen synthetisiert und sezerniert (Heymans, Luttun et al. 1999) und ist selbst nur ein Endglied der oben genannten posttranslatorisch Aktivierungskaskade und kann durch MMP-1, -2, -3, -7, -10 oder -13 aktiviert werden. Des Weiteren sind Plasmin und andere Serinproteasen im Stande MMP-9 zu aktivieren (Van den Steen, Dubois et al. 2002; Nagase, Visse et al. 2006). Wenn MMP-9 sezerniert und aktiviert ist, kann ihre Aktivität immer noch durch Degradierung oder Inhibition reguliert werden. Als universeller Proteaseinhibitor kann z.B. α_2 -Makroglobulin MMP-9 inhibieren (Curry, Mann et al. 1990). Bedeutender ist TIMP-1, welches mit einer hohen Affinität an der Hämopexindomäne im EZR bindet (Murphy and Docherty 1992).

Eine erhöhte MMP-9 Produktion wird bei Zellfunktionen, wie z.B. Zellwachstum, Differenzierung und Migration beobachtet (McCawley, Li et al. 1999; Chang and Karin 2001). Zu den Substraten von MMP-9 zählen Kollagen Typ IV und denaturiertes Kollagen, Fibronectin, Elastin und Laminin. Neben diesen strukturellen Komponenten sind weitere funktionelle Proteine Substrate von MMP-9, wie z.B. TGF- β , proTNF- α und IL-1 β (Van den Steen, Dubois et al. 2002).

Aufgrund des hier dargestellten ist es vorstellbar, dass MMP-9 auch eine bedeutende Rolle bei kardiovaskulären Erkrankungen spielt. Verglichen mit gesunden Patienten wurden erhöhte Werte an MMP-9 im Plasma von Patienten mit akutem Koronarsyndrom gefunden (Kai, Ikeda et al. 1998; Fukuda, Shimada et al. 2006). Zudem konnte eine Korrelation zwischen kardiovaskulärer Mortalität und der MMP-9 Konzentration im Plasma von Patienten mit stabiler oder instabiler Angina pectoris gezeigt werden (Blankenberg, Rupprecht et al. 2003). Untersuchungen von vulnerablen atherosklerotischen Läsionen zeigten eine gesteigerte Akkumulation von mononukleären inflammatorischen Zellen und eine gesteigerte gelatinolytische Aktivität (Galis, Sukhova et al. 1994). Im Vergleich zu Patienten ohne akute Ischämien konnte in humanen Koronararterien von Patienten mit Atherosklerose und Angina pectoris mit akuten Ischämien und neuer Plaqueruptur mittels Immunhistochemie gezeigt werden, dass sowohl in Makrophagen und glatten Muskelzellen als auch in der extrazellulären Matrix MMP-9 vermehrt lokalisiert war (Brown, Hibbs et al. 1995). Im Tiermodell der apoE $-/-$ Maus ergab eine selektive

Überexpression von aktivem MMP-9 in Makrophagen ein vermehrtes Auftreten von Fissuren in atherosklerotischen Plaques (Gough, Gomez et al. 2006). Auf zellulärer Ebene wird prinzipiell der größte MMP-9 Anteil von Monozyten und von diesen abstammenden Makrophagen produziert und sezerniert (Brown, Hibbs et al. 1995; Chase, Bond et al. 2002; Stawowy, Meyborg et al. 2005).

Diese Daten verdeutlichen eine Schlüsselrolle von MMP-9 in der Entwicklung und Progression von atherosklerotischen Läsionen. Besonders bei insulinresistenten Patienten mit begleitender Hyperinsulinämie zeigten sich erhöhte Werte im Serum im Vergleich zu insulinsensitiven Kontrollgruppen (Ghanim, Aljada et al. 2004). Fraglich ist, ob Insulin hier selber direkt über die Induktion von MMP-9 einen Einfluss auf die schon im prädiabetischen Zustand progrediente Atherosklerose haben könnte.

2.3. Fragestellung

Atherosklerose ist eine chronisch inflammatorische Erkrankung, die durch die Akkumulation von Lipiden, glatten Gefäßmuskelzellen und mononuklearen Zellen in der Gefäßwand charakterisiert ist (Libby 2006). Atherosklerotische Läsionen sind durch eine gesteigerte Expression von Matrix Metalloproteinasen gekennzeichnet (Newby 2005).

Klinische Studien zeigen, dass Plasmaspiegel von MMP-9 in adipösen, insulinresistenten Patienten erhöht sind, welche ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko tragen (Pyorala, Miettinen et al. 2000; Dominguez-Rodriguez, Abreu-Gonzalez et al. 2006; Glowinska-Olszewska and Urban 2007).

Insulinresistenz führt zur Hyperinsulinämie und ist durch einen Post-Rezeptordefekt gekennzeichnet, in welchem die metabolische PI3-Kinase Signaltransduktionskaskade gestört ist, wobei die mitogene MAPK Signaltransduktionskaskade intakt bleibt. (Jiang, Lin et al. 1999; Cusi, Maezono et al. 2000; Jonas, Edelman et al. 2005). Deshalb war das Ziel dieser Arbeit die in vitro Regulation von MMP-9 in humanen THP-1 Monozyten durch Insulin zu untersuchen und mögliche Signaltransduktionskaskaden zu identifizieren.

Im Einzelnen sollte untersucht werden:

1. eine zeit- und konzentrationsabhängige Regulation von MMP-9 durch Insulin mit der THP-1 Monozyten Zelllinie.
2. die Aktivierbarkeit des zu messenden pro-MMP-9 zu aktivem MMP-9 durch APMA.
3. die Expression des Insulinrezeptors auf THP-1 Monozyten und dessen Beteiligung in der durch Insulin vermittelten MMP-9 Induktion.
4. die beteiligten Signaltransduktionen bei der Insulin abhängigen MMP-9 Induktion.

3. Material und Methoden

3.1. chemische Substanzen

Chemikalien:

Acrylamid 30	Roth, Rotiphorese Gel 30, # 3029.1
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt, Deutschland
APMA	Sigma, Deisendorf, Deutschland
Brij 35 Solution 30 %	Sigma, Deisendorf, Deutschland
Coomassie	Brillant Blue G, # B-0770
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälberserum	Biochrom KG, # S0115
Gelladepuffer	Roth, Roti-Load 1, # K929.1
Glycerin	Carl Roth GmbH + Co. KG
Glycine	Carl Roth GmbH + Co. KG
L-Glutamin	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Magermilchpulver	Neuform, Frema Reform
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma, Deisendorf, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Deisendorf, Deutschland
Natronlauge	Merck, Darmstadt, Deutschland
Nitrocellulosemembran (NC)	Bio-Rad Laboratories GmbH
PBS (mit Ca ²⁺ / Mg ²⁺)	Dulbecco's, Gibco, # 14040-091
Penicillin	Biochrom KG, Berlin, Deutschland

PMSF	Sigma, Deisendorf, Deutschland
Propidiumjodid	Sigma, Deisendorf, Deutschland
Re-Blot Plus Strong Solution (10x)	Chemicon, # 2504
RPMI 1640 ohne L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, # E 15-039
Salzsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG
Streptomycin	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
TWEEN-20	Sigma, Deisendorf, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, # 2367.3
TRIS-Base	Carl Roth GmbH + Co. KG
Triton X-100	Sigma, Deisendorf, Deutschland

Pharmakologische Substanzen:

Actinomycin D	Sigma, # A1410
Angiotensin II	Sigma, # A9525
Cycloheximide	Sigma, # C4859
decanoyl-RVKKR-chloromethylketone (dec-CMK)	Bachem, # N1505
IGF-1	Biossource, # PHG0074
Insulin	Sigma, # I9278
Ly294002	Calbiochem, # 440204
Ly303511	Alexis, # 270-410
PD98059	Calbiochem, # 513000
Rapamycin	Biomol GmbH, # A-275
SB203580	Calbiochem, # 559389
SB600125	Calbiochem, # 426119
TNF- α	Tebu, #300-01A
U0124	Calbiochem, # 662006

U0126	Calbiochem, # 662005
Wortmannin	Calbiochem, # 681675

3.2. Antikörper

Western Blot:	Firma	Produkt-Nr.	Konz.	Herkunft
Akt	Cell Signaling	9272	1:1000	Kaninchen
Akt-(phospho Ser 473)	Cell Signaling	9271	1:1000	Kaninchen
eNOS-(phosphoSer1177)	Cell Signaling	9571	1:1000	Kaninchen
p38 MAPK (phosphoThr180/Tyr182)	Cell Signaling	9211	1:1000	Kaninchen
GSK-3 β (27C10)	Cell Signaling	9315	1:1000	Kaninchen
GSK-3 α/β - (phospho Ser 21/9)	Cell Signaling	9331	1:1000	Kaninchen
p42/44 MAPK	Cell Signaling	9102	1:1000	Kaninchen
p70S6K- (phosphoThr421/Ser424)	Cell Signaling	9204	1:1000	Kaninchen
Insulin R β (C-19)	Santa Cruz	sc-711	1:200	Kaninchen
MMP-9	Lab Vision	MS-817	2 μ g/mL	Maus
FACS:				
Furin (MON152)	Alexis Biochemicals	803-017- R100	1:1000	Kaninchen
Insulin R α	Dianova	DLN-10220	1:1000	Maus
GoatF(ab') ₂ -anti-rabbit IgG (H+L)-FITC	Vector	FI-1000	1:5000	Ziege
Goat-anti-mouse IgG (H+L)-FITC	Jackson- Immuno.	115-096-062	1:5000	Ziege
Kontrollantikörper IgG	Sigma	R5506	1:5000	Kaninchen
Kontrollantikörper IgG1	Diatec	2010	1:5000	Maus

 sonstige Antikörper:

IGF-1R α blocking AK (clone 1H7)	Santa Cruz	sc-461	1:1000	Maus
--------------------------------------------	------------	--------	--------	------

3.3. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Airflowbench	Nuaire, Model-Nr.: 437-600E
BCA Lesegerät+Drucker	Dynatech MR 7000
Brutschrank	Heraeus Instruments, CO ₂ -Auto-Zero
Elektrophoresesystem	Biorad, Miniprotean 3
Entwicklungsfilm	Kodak; BioMax Light Film, # 8194540
Eppendorfgefäße	Safe-Lock Tubes 1,5 mL, # 0030 120.086
FACS Gerät	Beckton-Dickinson, Biosciences, USA
Falconröhrchen (50 mL)	Falcon, Blue MAX, 50 mL, REF 352070
Falconröhrchen (15 mL)	Falcon, Blue MAX, 15 mL, REF 352095
Filmentwicklungsmaschine	AGFA; Curix 60
Hitzblock	Roth, Test Tube Thermostat TCR 100
Mikroskop	Zeiss, Axiovert 10, Deutschland
pH-Meter	Mettler, Delta 320
Taumlern/ Schüttler	Heidolph, Promax 1020
Transwellsystem	Falcon, Heidelberg, Deutschland
Zellkulturflaschen	Falcon, Tissue Culture Falsks 175 cm ² , REF 353112
Zellkulturschalen	Falcon, Blue MAX, 100x20 mm, REF 350003
Zentrifuge (4°C)	Heraeus Instruments, Biofuge fresc o
Zentrifuge (RT)	Heraeus Instruments, Sepatech, Megafuge 1.0

3.4. Zellkultur

In den Experimenten wurden humane Monozyten der Zelllinie THP-1 verwendet, die von der „Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)“ stammten (# ACC 16). Die in Suspension wachsenden Zellen wurden in Zellkulturflaschen bei 37°C und 5 % CO₂-Zufuhr im Brutschrank kultiviert. Dreimal wöchentlich wurden die Zellen in frisches 10 % fetales Kälberserum (FKS) Kulturmedium unter sterilen Bedingungen umgesetzt, das aus 500 mL RPMI 1640 ohne L-Glutamin, 10 % fetalem Kälberserum, 1 % L-Glutamin (200 nmol/L), 1 % Penicillin (100 U/mL) und 1 % Streptomycin (100 µg/mL) bestand.

Vor dem Passagieren wurden die Monozyten unter dem Lichtmikroskop begutachtet, die Zellsuspension aus den Zellkulturflaschen in 50 mL Falconröhrchen überführt und bei 1200 U/min. drei Minuten zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet mit 20 mL frischem 10 % FKS Medium resuspendiert und die Zellzahl nach Neubauer (siehe unten) bestimmt. Es wurden $\leq 1 \times 10^6$ Zellen / mL in den Zellkulturflaschen aufgenommen, wobei ein konstantes Gesamtvolumen von 100 mL Medium pro Flasche eingehalten wurde.

Für die Experimente wurden THP-1 Monozyten der Passage sieben bis max. 17 verwendet, da in höheren Passagen eine im Lichtmikroskop sichtbare morphologische Umdifferenzierung der in Suspension einzeln oder auch in Clustern vorliegenden Monozyten zu adhären Zellen zu erkennen war. Die unregelmäßig geformte Zelloberfläche wies dann pseudopodienartigen Mikrovilli auf. Im Vergleich dazu zeigten die Monozyten eine regelmäßig glatte runde Zelloberfläche.

Die für die Experimente auszuzählenden Zellpellets wurden in einem Volumen von 20 mL 0 % FKS Medium resuspendiert, welches aus 500 mL RPMI 1640 ohne L-Glutamin bestand, das mit 1 % L-Glutamin (200 nmol/L), 1 % Penicillin (100 U/mL) und 1 % Streptomycin (100 µg/mL) angereichert war. Die Bestimmung der THP-1 Monozytenzellzahl wurde durch die Kammerauszählung nach der Methode von Neubauer durchgeführt, wobei jeweils ein Aliquot der 20 mL Zellsuspension in

Eppendorfgläsern auf 1:20 und 1:40 verdünnt wurde, die dann einzeln in die Neubauerzählkammern aufgetragen wurden.

Unter dem Mikroskop (400-fache Vergrößerung: Objektiv 40-fach, Okular 10-fach) wurden bei dieser Methode nacheinander vier Großquadrate mäanderförmig ausgezählt, von denen jedes in 16 Kleinquadrate unterteilt war (Abb. 5.a, b). Bei optimaler Verdünnung war die Anzahl in allen vier Großquadraten ungefähr gleich. Analog musste die Anzahl der anderen Verdünnung halb so groß bzw. doppelt so groß sein. Es wurden nur die Zellen ausgezählt, die sich hell leuchtend und rund darstellten; andere Strukturen ignoriert.

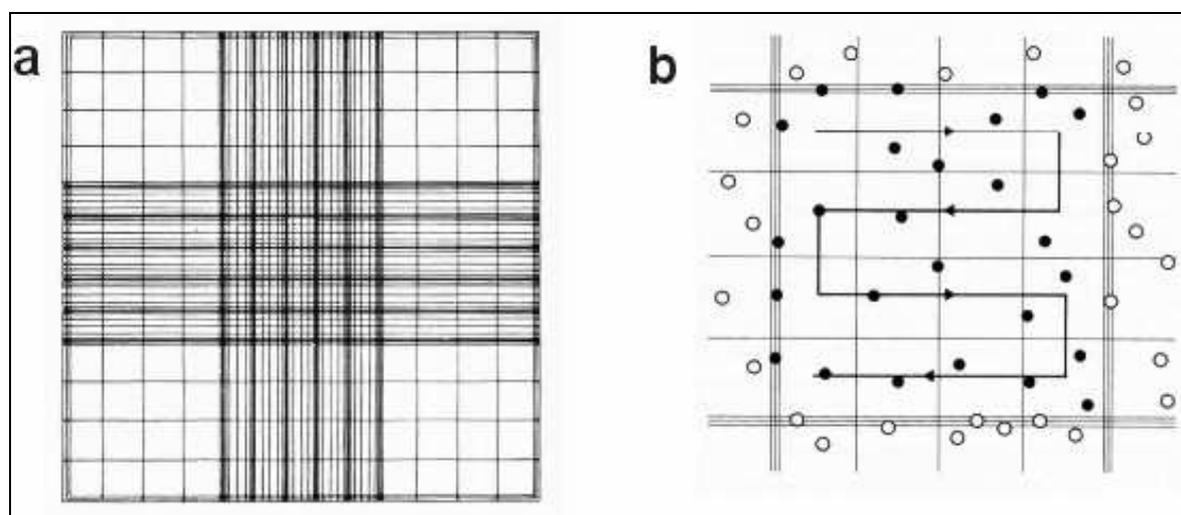


Abbildung 5. a: Netzteilung einer Neubauer-Zählkammer mit 4 Großquadraten in den Ecken. **5. b:** Auszählen der Zellen (schwarz) in einem äußeren großen Quadrat der Zählkammer, ignorierte Zellen sind weiß dargestellt.

Aus den Summen der ausgezählten Monozyten der jeweiligen vier einzelnen Quadranten (Abb. 5.a) wurde der Mittelwert gebildet. Die weitere Berechnung erfolgte nach der Formel:

$$\text{Zellen} / \text{mL} = m \times v \times K$$

m = Mittelwert, v = Verdünnungsfaktor (1:20 bzw. 1:40)

$$K = 1 \cdot 10^4 = \text{Kammerkonstante}$$

Nach Auszählung und Berechnung beider Verdünnungen wurde aus beiden noch einmal ein Mittelwert berechnet.

Durch diese Auszählung konnten 4×10^6 Zellen in 4 mL 0 % FKS Medium in Zellkulturschalen für Experimente aufgenommen und anschließend stimuliert werden bzw. 1×10^6 Zellen in 100 mL 10 % Medium in Zellkulturflaschen zur normalen Kultivierung ausgesetzt werden.

16 Stunden vor einem Experiment wurden die Zellen aus den Zellkulturflaschen entnommen. Nach zweimaligem Waschen in 50 mL Falconröhrchen mit je 20 mL 0 % FKS Medium wurden 4×10^6 Zellen pro mL in jeweils 4 mL 0 % Kulturmedium in Zellkulturschalen aufgenommen. In Inhibitionsexperimenten wurden die Monozyten nach der 16-stündigen Synchronisation in 0 % FKS Medium je nach Indikation mit den jeweiligen pharmakologischen Inhibitoren vorbehandelt, bevor sie mit weiteren pharmakologischen Substanzen inkubiert wurden.

Bei Experimenten mit dem Furin-Inhibitor dec-CMK erfolgte eine Vorbehandlung über 16 Stunden. Alle anderen pharmakologischen Inhibitoren wurden eine halbe Stunde vor Stimulation vorinkubiert.

Nach Zugabe des Stimulans bzw. des Inhibitors wurden die Zellen bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert.

Jede Stimulation oder Inhibition erfolgte unter sterilen Bedingungen und es schloss sich eine Begutachtung unter dem Lichtmikroskop an.

Das aus den Zellkulturflaschen entnommene Volumen für Experimente wurde durch 10 % FKS Medium ersetzt, so dass ein konstantes Mediumvolumen von 100 mL in den Zellkulturflaschen beibehalten wurde.

3.5. Proteinextraktion und Proteinbestimmung

Nach abgelaufener Stimulationszeit wurden unter sterilen Bedingungen je 3 mL steriles, 4°C kaltes PBS (Ca²⁺/Mg²⁺) in die Zellkulturschalen zugegeben. Die Zellen wurden in ein 15 mL Falconröhrchen überführt und drei Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Das verbliebene Pellet wurde mit 1 mL 4°C kaltem PBS (Ca²⁺/Mg²⁺) resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Es folgte eine weitere Zentrifugation von drei Minuten bei 2500 U/min bei 4°C. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet mit 100 µL frisch

angesetztem Zellextraktionspuffer resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Proben zehn Minuten bei 13000 U/min und 4°C zentrifugiert. Der sich bildende Überstand beinhaltet die zellulären Proteine und wurde für die Westernblotanalyse verwendet. Die Proteinkonzentration der Proben wurde nach Lowry bestimmt und mit dem BCA Protein Assay Reagent Kit durchgeführt. Es wurde eine Standardreihe aus BSA 2 mg/mL angefertigt. Diese und die jeweiligen Proteinproben wurden 1:10 auf ein Gesamtvolumen von 50 µL mit H₂O verdünnt. Jeder Wert wurde im Doppelansatz in ein 96 Transwellssystem aufgetragen. Die BCA Regenten A und B wurden in einem Verhältnis von 50:1 gemischt. Jeweils 300 µL des gemischten BCA Regent wurden in jedes Well dazugegeben und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Proteinkonzentrationen und die Berechnung der Eichgraden wurden mit dem Photometer bei einer Wellenlänge von 562 nm analysiert.

Zellextraktionspuffer	1 mL Cell Lyse Buffer; Biosource, # FNN 0011 5 µL Protease-Inhibitor ;Calbiochem, # 539134 3,4 µL 0,3 M PMSF in DMSO
BCA Protein Assay Reagent A	Pierce, # 23228
BCA Protein Assay Reagent B	Pierce, # 23224
Bovines Serum Albumin (BSA)	Pierce, # 23209
Cell Lyse Buffer	Biosource, # FNN 0011

3.6. Gewinnung von zellfreiem Überstand für die Gelatin-Zymographie

Nach der Stimulation wurden je 500 mL des Kulturmediums steril abgenommen. Die Proben wurden bei 1200 U/min drei Minuten zentrifugiert um die Monozyten und Zelltrümmer vom Medium abzutrennen. Der Überstand konnte sogleich in der Gelatin-Zymographie verwendet werden oder wurde bei -20°C eingefroren.

3.7. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Elektrophoresen wurden im Elektrophoresesystem Miniprotean 3 von Bio-Rad durchgeführt. Dabei hatten die Glasplatten und damit die gegossenen Gele eine Größe von 8,0 cm x 7,3 cm. Die Spacer und Kämmen waren in der Gelatin-Zymographie 1 mm und im Western Blot 1,5 mm breit.

Nach Herstellung des Trenngels wurde es zwischen die zwei senkrecht stehenden Glasplatten pipettiert und anschließend mit Wasser überschichtet. Nach 30 Minuten war das Gel auspolymerisiert. Das überschichtete Wasser wurde abgegossen, so dass das gemischte Sammelgel darauf pipettiert werden konnte. In dieses wurde ein 1 mm bzw. 1,5 mm dicker Kamm geschoben, der Platz für die späteren Probenaschen aussparte. Nach weiteren 15 Minuten war auch das Sammelgel auspolymerisiert und der Kamm konnte hinausgezogen werden. Die Taschen wurden umgehend mit Elektrophoresepuffer gespült. Die Glasplatten, dazwischen das Elektrophoresegel, wurden nun in die Laufkammer eingesetzt und mit Elektrophoresepuffer so befüllt, dass die beiden Kammern keine Verbindung über den Puffer zu einander hatten.

Trenngel 10 % (2 Gele)	1 mL Gelatine + 7 mL H ₂ O + 6,6 mL Acrylamid + 5 mL Trenngelpuffer + 200 µL 10 % SDS-Lösung + 200 µL 10 % APS + 8 µL TEMED
Trenngel 8 % (2 Gele)	9,3 mL H ₂ O + 5,3 mL Acrylamid + 5 mL Trenngelpuffer + 200 µL 10 % SDS-Lösung + 200 µL 10 % APS + 12 µL TEMED
Sammelgel 5 % (2 Gele)	5,5 mL H ₂ O + 1,3 mL Acrylamid + 1 mL Sammelgelpuffer + 80 µL 10 % APS + 80 µL 10 % SDS-Lösung + 8 µL TEMED

10 % SDS-Lösung	50 g Sodiumdodecylsulfat in 500 mL H ₂ O lösen, RT lagern
10 % APS-Lösung	1 g Ammoniumpersulfat in 10 mL H ₂ O lösen, 4°C lagern
5x Elektrophoresepuffer	15,1 g Tris-Base + 94 g Glycine + 50 mL 10 % SDS, ad 1 L H ₂ O
Trenngelpuffer	181,71 g Tris-Base in 500 mL H ₂ O lösen → pH mit HCL auf 8,8 einstellen, ad 1 L H ₂ O
Sammelgelpuffer	121,14 g Tris-Base in 500 mL H ₂ O lösen → pH mit HCL auf 6,8 einstellen, ad 1 L H ₂ O
Elektrophorese-Marker	Fermentas Life Sciences, # SM0671

3.8. Gelatin-Zymographie

Die Gelatin-Zymographie ist eine Detektionsmethode für Gelatinasen, die in Form von MMP-2 und MMP-9 von humanen THP-1 Monozyten in serumfreies Kulturmedium abgegeben werden. In gelatinehaltigen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen kann die Quantifizierung von MMP-2/ -9 durch die proteolytische Aktivität, d.h. durch den Abbau der, sich im Polyacrylamidgel (10 %) befindenden Gelatine bestimmt werden, indem man die gelatinefreien Banden nach Coomassiefärbung sichtbar macht.

Die verwendete Gelatine wurde aus 2 g Gelatine gelöst in 100 mL Wasser hergestellt, aliquotiert und anschließend bei 4°C gelagert. Bei Gebrauch wurde ein Aliquot in einem Wasserbad (70°C) erhitzt. Die benötigte Menge wurde steril entnommen.

Als Standardprobe verwendeten wir Überstände der humane Fibrosarkom-Zelllinie HT-1080, welche konstitutiv große Mengen von pro-MMP-2 und pro-MMP-9 sezerniert. Die Zellen stammten von der DSMZ GmbH (# ACC 315).

Die gewonnenen zellfreien Überstände der THP-1 Monozyten und die Standardprobe (HT-1080) wurden mit 37°C erwärmten Probenpuffer auf 1:2 verdünnt und anschließend in die Probenflaschen des Sammelgels pipettiert. Vom Elektrophorese-Marker wurden unverdünnt 8 µL, von der Standardprobe verdünnt 10 µL pro Probenflaschen verwendet.

Die verwendete Menge der zellfreien Überstände der THP-1 Monozyten betrug je nach Experiment zwischen 20 µL und 40 µL, wobei das Volumen innerhalb eines Experimentes gleich gehalten wurde.

Nach dem Auftragen wurde eine Spannung von 80 mV angelegt. Die Spannung wurde auf 100 mV erhöht, sobald die Proben in das Trenngel eingelaufen waren. Beendet wurde die Elektrophorese, wenn sich die 72 kDa Bande des Markers in der Mitte des unteren Drittels des Gels befand. Das Trenngel wurde zwei Mal für je 15 Minuten in Waschpuffer und danach 30 Minuten in Entwicklungspuffer gewaschen, um anschließend in frischem Entwicklungspuffer über Nacht bei 37°C inkubiert zu werden. Es folgte die Coomassiefärbung für ca. 1 Stunde bis das Gel eine kräftig blaue Färbung erreicht hatte. Danach erfolgte die Entfärbung für ca. 1 Stunde, bis deutlich helle Banden auf dunkel blauem Hintergrund zuerkennen waren. Diese Banden repräsentierten die Gelatinasenaktivität der Probe. Folgend wurden die Gele für mindestens 1 Stunde in Einpackpuffer gegeben. Waschgänge, Färbung und Entfärbung sowie das Einpacken wurden auf einem Taumler durchgeführt.

Um die Gele im Weiteren einscannen zu können, wurden sie in einem Rahmen zwischen zwei Gelatinefolien eingespannt und getrocknet.

Gelatine	Sigma, # G-2625, 100g, Type A, from porcine skin, approx. 175 bloom
Probenpuffer	Invitrogen Life Technologies, Novex Tris-Glycine SDS Sample Buffer (2x), # LC 2676
10x Waschpuffer	25 % Triton X-100
10x Entwicklungspuffer	12,1 g Tris-Base + 63 g Tris-HCL + 117 g NaCl + 7,4 g CaCl + 0,2 % Brij, ad 1 L H ₂ O

Coomassiefärbung	0,5 % Coomassie + 30 % Methanol + 10 % Essigsäure, ad 1 L H ₂ O
Coomassieentfärber	50 % Methanol + 10 % Essigsäure, ad 1 L H ₂ O
Einpackpuffer	20% Ethanol + 10 % Glycerin, ad 1 L H ₂ O
Gelatinefolien	Alba, Einmach-Haut

3.9. Western Blot

Der Western Blot diente der Identifikation und Quantifizierung spezifischer Proteine aus zellulären Proteingemischen, die aus humanen THP-1 Monozyten isoliert wurden.

Nach der Auftrennung der Proteine nach ihrer molekularen Masse im elektrischen Feld durch die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurden sie auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Auf dieser Membran erfolgte der Nachweis eines bestimmten Proteins mittels eines spezifischen Antikörpers. Der gebundene Erstantikörper wurde durch einen zweiten Antikörper, an den das Enzym Peroxidase gekoppelt war, detektiert.

Die Zusammensetzung der Polyacrylamidgele für den Western Blot erfolgte gleich den Gelatin-Zymographiegelen, wobei die Gelatine in ihrem Volumen durch H₂O ersetzt wurde.

Sollten Proteine mit einem Molekulargewicht >100 kDa dargestellt werden, wurden anstatt der 10 % Trenngele 8 % Trenngele verwendet.

Die Proben wurden je nach Konzentration des Proteins aufbereitet, um pro Probe 50 µg/mL Protein auftragen zu können. In jede Tasche wurden 50 µL aufgetragen, wovon jeweils 10 µL Gelladepuffer, 50 µg/mL Proteinprobe waren und der Rest durch H₂O aufgefüllt wurde.

Diese Probenansätze wurden fünf Minuten bei 95°C auf einem Hitzblock erwärmt. Anschließend wurden die Proben mindestens drei Minuten auf Eis herunter gekühlt. Danach folgte eine kurze Zentrifugation.

Die je 50 μL Proben wurden in die Geltaschen aufgetragen. In die erste Tasche wurden 8 μL Elektrophorese-Marker gegeben. Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 80 mV gestartet und auf 100 mV erhöht, sobald die Proben in das Trenngel eingelaufen waren.

Nach der jeweiligen Laufzeit der Elektrophorese folgte der Schritt des Blottens. Hierbei wurden die im Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dieser Transfer wurde bei einer Spannung von 100 mV für 1 Stunde unter der Verwendung von Transferpuffer durchgeführt.

Die nun, mit den aufgetrennten Proteinen, geblottete Nitrozellulosemembran wurde 1 Stunde mit 5 % Magermilch inkubiert. Danach wurden die Membranen mit den jeweiligen Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden sie dreimal zehn Minuten mit 1x TBS gewaschen. Anschließend konnte der Zweitantikörper für 2 Stunden bei RT inkubieren. Dreimal zehnjähriges Waschen mit 1x TBS folgte. Danach wurde das Detektionsregens aus A und B 1:2 frisch hergestellt und die Nitrozellulosemembran zwei Minuten inkubiert. Das emittierende Signal konnte mittels auflegen eines Fotofilms detektiert werden.

Um einen Blot mehrfach mit verschiedenen Antikörpern inkubieren zu können, musste der zuletzt verwendete Antikörper von der Nitrozellulosemembran mit Stripping-Lösung entfernt werden. Gestrippt wurde die Nitrozellulosemembran fünf Minuten unter starkem schaukeln. Danach folgte kurzes waschen mit 1x TBS und der Blot konnte wieder mit 5 % Magermilch geblockt werden.

Die Waschgänge, Inkubationen und Strippings wurden auf einem Taumler durchgeführt.

5x TBS	24,2 g Tris-Base + 80 g NaCl -> pH mit HCL auf 7,6 einstellen, ad 2 L H ₂ O
1x TBS	400 mL 5x TBS + 4 mL 1:2 verdünnte TWEEN-20, ad 2 L H ₂ O
5x Transferpuffer	144 g Glycine + 30,3 g Tris-base, ad 2 L H ₂ O

1x Transferpuffer	200 mL 5x Transferpuffer+ 200 mL Methanol, ad 1 L H ₂ O
Magermilch (5 %)	2,5 g ad 50 mL TBS
Stripping-Lösung	1 mL ad 10 mL TBS
Western blotting detection reagents A	Amersham, # 1059243
Western blotting detection reagents B	Amersham, # 1059250

3.10. Charakterisierung von Oberflächenmerkmalen durch Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

Die Durchflusszytometrie bzw. FACS-Analyse ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Bei den im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit durchgeführten Messungen wurden THP-1 Monozyten im FSC/ SSC dot plot gegatet. Mit der Analyse der Durchflusszytometrie wurde die Expression der Oberflächenmoleküle des Insulinrezeptors und der Proprotein Convertase Furin auf THP-1 Monozyten mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern analysiert und im Histogramm darstellt.

Dazu wurden am Tag der Messung die THP-1 Zellen der Kultur entnommen, auf 2×10^5 Zellen pro Probe ausgezählt und anschließend bei 1200 U/min für drei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in 300 μ L Waschlösung aufgenommen und bei 500 U/min. für fünf Minuten bei 5°C zentrifugiert. Der Überstand wurde ein weiteres Mal abgenommen.

Bevor spezifische Antikörper inkubiert wurden, wurde ein Zytotoxizitätstest durchgeführt, wobei die Nekroserate der THP-1 Monozyten bestimmt wurde. Hierbei wurde die THP-1 Monozyten mit Propidiumjodid (8 μ g/mL) über 30 Minuten inkubiert und mit dem FACS Gerät im Fluoreszenz-2-Kanal bei ca. 200000 Events gemessen und der Anteil der vitalen THP-1 Monozyten bestimmt.

Anschließend wurden in 1 mL PBS die kontrollierenden Isotypenantikörper (Rabbit IgG / Mouse IgG1) bzw. spezifischen Antikörper gegen Furin oder gegen die Insulinrezeptoruntereinheit α in der oben genannten Konzentration zugegeben und für 30 Minuten bei 5°C inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift der Zellsuspension um nicht gebundene Antikörper zu entfernen bevor die entsprechenden sekundären Antikörper GoatF(ab')₂-anti-rabbit IgG (H+L)-FITC und Goat-anti-mouse IgG (H+L)-FITC für weitere 30 Minuten im Dunkeln bei 5°C inkubiert wurden. Danach folgte ein letztes Waschen in der Waschlösung, worin sie anschließend auch aufgenommen wurden.

Das Fluoreszenzsignal der Zellen wurde mit dem FACS Gerät im Fluoreszenz-1-Kanal bei den jeweiligen Events pro Probe unmittelbar gemessen. Anschließend wurden die Fluoreszenzsignale in Form von Histogrammen dargestellt. Im Fluoreszenzhistogramm ist auf der x-Achse der Wert logarithmisch für die Helligkeit der Fluoreszenz aufgetragen. Diesen Werten ist auf der y-Achse die absolute Anzahl von THP-1 Monozyten, die mit dieser Fluoreszenz erfasst wurden, zugeordnet.

Waschlösung 0,2 % PBS + 0,15 % NaN₃ + 1 mg/mL BSA hlgG

3.11. Datenanalysen

Die entwickelten Filme der Western Blots und die Gelatin-Zymographiegele wurden gescannt und anschließend mit dem Programm NIH 1.62 densitometriert, welches durch das National Institute of Health (NIH) zur freien Verfügung gestellt wird.

Die in den graphischen Diagrammen gezeigten Daten der Western Blots oder Gelatin-Zymographien sind Mittelwerte und wurden aus mindestens drei Experimenten gewonnen. Sie sind als arbiträre Einheiten (A.U.; arbitrary units) dargestellt. Die desitometrierten Daten wurden in SPSS 11.0 für Windows vergleichend mit der 1-way ANOVA analysiert. Anschließend wurden die Gruppen multipel nach Bonferroni / Dunn verglichen. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant definiert.

Die Daten der Durchflusszytometrie resultierten aus der Messung der Fluoreszenz der Zellen. Das Fluoreszenzhistogramm, die Mediankalkulation und die durchschnittlichen Fluoreszenzwerte wurden mit der WinMDI 2.8 Software durchgeführt, nachdem das Programm auf die humanen THP-1 Monozyten in dem FSC/SSC dotplot gated wurde.

4. Ergebnisse

4.1. Insulin induziert MMP-9 in humanen THP-1 Monozyten

Um die Wirkung von Insulin auf die Matrix Metalloproteinase MMP-9 zu untersuchen, wurden THP-1 Monozyten für 16 Stunden synchronisiert (0 % FKS) und anschließend mit 10 nmol/L Insulin für 24 Stunden stimuliert. Zum Vergleich dienten THP-1 Monozyten, die jeweils mit 1 μ mol/L Angiotensin II oder 10 ng/mL TNF- α über dieselbe Zeit stimuliert wurden. TNF- α ist ein bekannter Induktor von MMP-9 in THP-1 Monozyten (Stawowy, Meyborg et al. 2005). Zudem gab es eine Kontrolle, die über die gesamte Zeit unstimuliert blieb und zum Vergleich diente.

Die zellfreien Überstände der jeweiligen Versuchsansätze wurden nach der Stimulation mittels Gelatin-Zymographie analysiert. Exemplarisch ist das Ergebnis eines Versuches in Abbildung 6.A abgebildet.

Sechs unabhängige Versuche stellten jeweils eine Bande in den Gelatin-Zymographiegelen auf der Höhe von 72 kDa und 92 kDa dar. Diese entsprachen der pro-MMP-2 und der pro-MMP-9 Bande, was die Standardprobe (HT1080) zeigte. Die Gelatin-Zymographien zeigten, dass Insulin und TNF- α die pro-MMP-9 steigerten, wohingegen Angiotensin II keinen Effekt hatte. Die nicht stimulierte Kontrolle zeigte eine geringe Expression von pro-MMP-2 und -9. Weder Insulin, TNF- α oder Angiotensin II hatten einen signifikanten Effekt auf die pro-MMP-2 Induktion.

Die aus der Gelatin-Zymographie (Abbildung 6.A) densitometrierten pro-MMP-9 Banden wurde mit der unstimulierten Kontrolle verglichen, wobei der Wert dieser unstimulierten Kontrolle 100 % entsprechen sollte. Die Auswertung ist in Abbildung 6.B dargestellt. Die mit 10 nmol/L Insulin stimulierten THP-1 Monozyten zeigten im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle eine signifikant ca. 2-fach gesteigerte Expression von pro-MMP-9 ($p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n=6$). Eine mehr als 2-fach gesteigerte Expression von pro-MMP-9 zeigte sich nach Stimulation mit 10 ng/mL TNF- α ($p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n=6$).

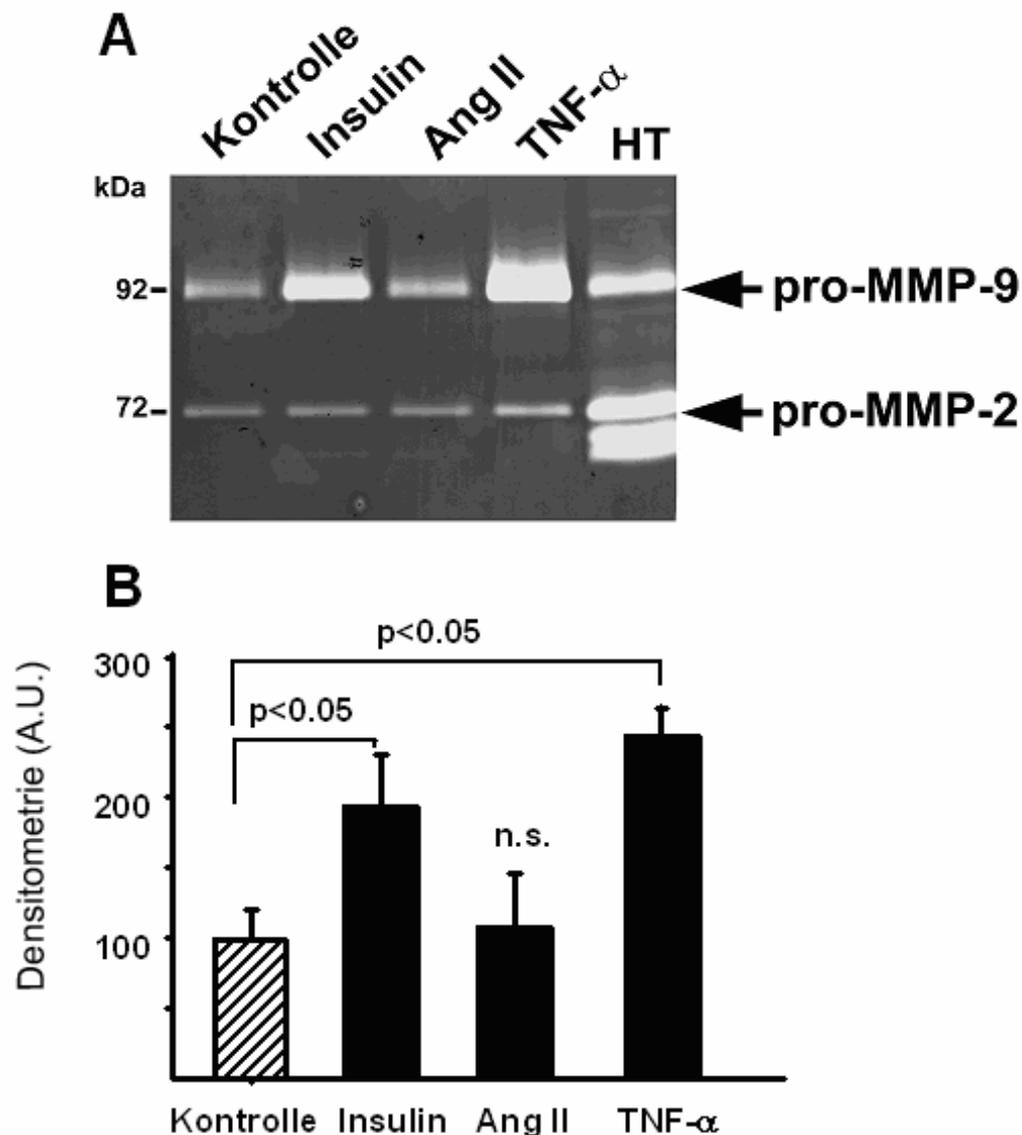


Abbildung 6. A: Exemplarisch dargestellte Gelatin-Zymographie, welche den Effekt von Insulin, Angiotensin II (Ang II) und TNF- α auf die Expression von pro-MMP-9 und pro-MMP-2 darstellt. 10 nmol/L Insulin und 10 ng/mL TNF- α zeigen eine gesteigerte Expression von pro-MMP-9. Ang II (1 μ mol/L) zeigt keinen Effekt. Pro-MMP-2 wurde in allen Proben gleich exprimiert. HT1080 (HT), als Standard verwendet, zeigt die Banden pro-MMP-9, pro-MMP-2 und aktivem MMP-2. **6. B:** Densitometrische und gemittelte pro-MMP-9 Daten. Die Daten sind auf die Kontrolle normalisiert, die 100 % gesetzt wurde. Insulin zeigt eine ca. 2-fach und TNF- α eine ca. 2,5-fach gesteigerte Expression von pro-MMP-9 ($p < 0,05$ vs. Kontrolle). Hingegen zeigt Angiotensin (Ang II) keine signifikante (n.s.) Induktion. ($n=6$).

4.2. Insulin induziertes MMP-9 ist durch APMA aktivierbar

In vivo ist MMP-9 eine Protease, die intrazellulär als Proform (pro-MMP-9) synthetisiert wird (Van den Steen, Dubois et al. 2002). Erst nach der Freisetzung in den Extrazellularraum kann sie durch andere Mitglieder der MMP-Familie oder durch verschiedene Serinproteasen mittels enzymatischer Spaltung aktiviert werden (Van den Steen, Dubois et al. 2002). Deswegen untersuchten wir, ob das durch Insulin induzierte, in der Gelatin-Zymographie messbare, pro-MMP-9 in seine aktive Form umgewandelt werden kann. Vergleichbar mit den aktivierenden in vivo vorkommenden Serinproteasen, aktiviert 4-Aminophenylmercuriumacetat (APMA) pro-MMP-9 (Galazka, Windsor et al. 1996).

Zunächst wurden THP-1 Monozyten 16 Stunden synchronisiert (0 % FKS), dann zum einen über 24 Stunden mit 10 nmol/L Insulin stimuliert, zum anderen nach der Synchronisation über 24 Stunden ohne Insulin Stimulation belassen. Von beiden Ansätzen wurden anschließend die gewonnenen zellfreien Überstände abgenommen und so aufgeteilt, dass ein Teil mit 1 mmol/L APMA und der andere Teil ohne APMA über vier Stunden inkubiert wurde. Die mit APMA aktivierten und die nicht mit APMA aktivierten Überstände wurden mittels Gelatin-Zymographie vergleichend untersucht (Abbildung 7).

Das in der Gelatin-Zymographie (Abbildung 7) dargestellte Signal für pro-MMP-9 wurde durch die Insulinstimulierung im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle induziert. Weiterhin wurde deutlich, dass durch die Inkubation mit 1 mmol/L APMA die pro-MMP-9 Bande bei 92 kDa deutlich abnahm, wohingegen die 82 kDa Form von MMP-9 (aktives MMP-9) zunahm. Die Ansätze ohne eine Stimulation mit APMA zeigten kein Signal von aktivem MMP-9. Die unstimulierten Zellen zeigten ein geringes pro-MMP-9 Signal und dementsprechend wurde durch APMA weniger aktives MMP-9 gebildet.

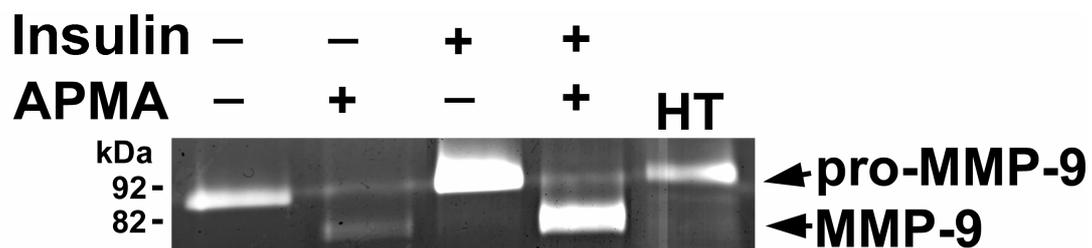


Abbildung 7: Exemplarische Gelatin-Zymographie von THP-1 Monozytenüberständen, die mit 4-Aminophenylmercuriacetate (APMA; 1 mmol/L; 4 h) inkubiert wurden. Die mit APMA inkubierten Ansätze zeigen eine Aktivierung von pro-MMP-9 (92 kDa) zu aktivem MMP-9 (82 kDa). HT1080 (HT)=Standart. (n=4).

4.3. Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit von Insulin und MMP-9

Weiter sollte eine Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit zwischen der Insulinstimulation und der pro-MMP-9 Induktion in THP-1 Monozyten dargestellt werden.

Nach einer 16-stündigen Synchronisation (0 % FKS) der THP-1 Monozyten wurden Konzentrationsreihen von 0.1 nmol/L bis zu 20 nmol/L Insulin über eine Stimulationszeit von 24 Stunden durchgeführt. Es wurden folgende Konzentration für diese Versuchsreihe verwendet: 0.1, 1, 5, 10 und 20 nmol/L Insulin. Nach 24 Stunden wurden die zellfreien Überstände entnommen und mit der Gelatin-Zymographie analysiert (Abbildung 8.A).

Hierbei zeigten die aus den Gelatin-Zymographien densitometrierten Daten ab einer Konzentration von 0,1 nmol/L Insulin eine signifikante (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle) Induktion von pro-MMP-9 (Abbildung 8.B). Diese Induktion steigerte sich proportional zur Insulinkonzentration. Zur Vergleichskontrolle lief eine unstimulierte Kontrolle über die Inkubationszeit von 24 Stunden parallel, die nach dieser Zeit eine schwache pro-MMP-9 Expression zeigte. Pro-MMP-2 wurde nicht durch Insulin induziert.

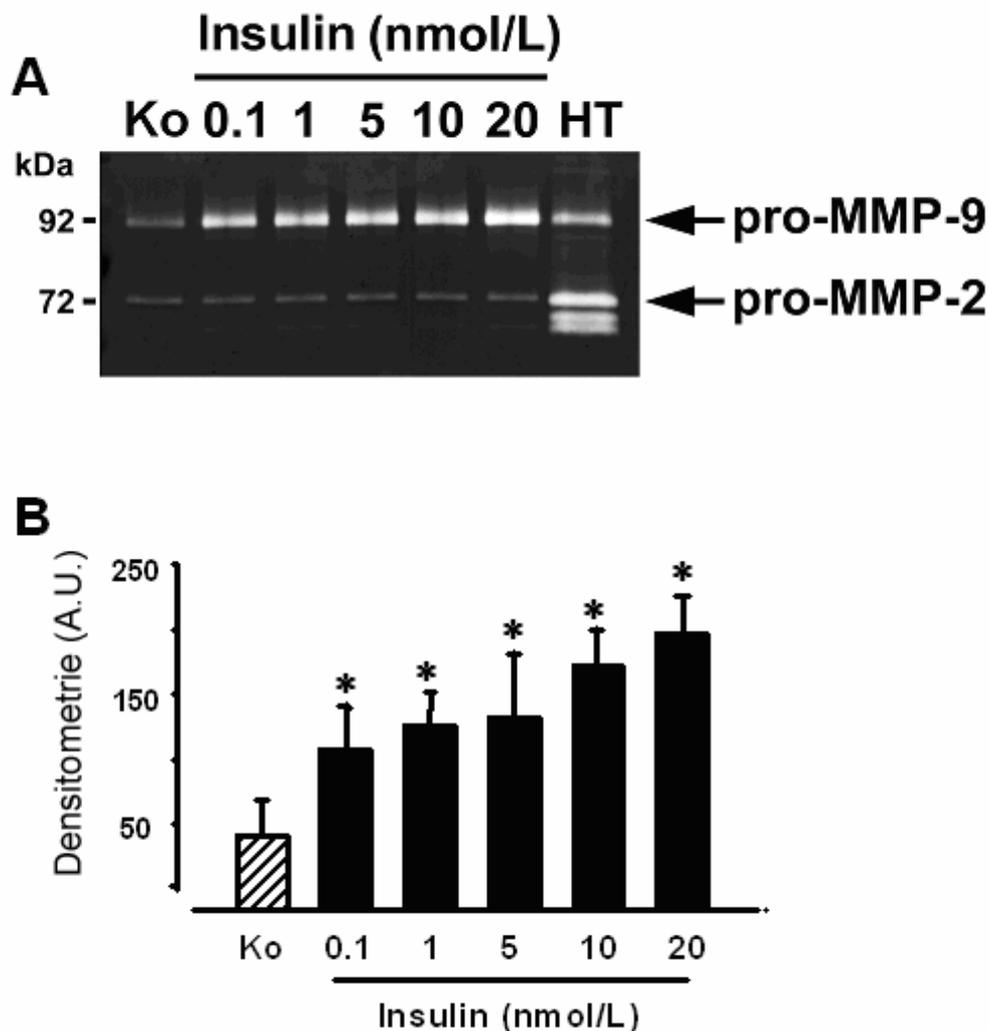


Abbildung 8. A: Exemplarische Gelatin-Zymographie, welche die Konzentrationsabhängigkeit zwischen Insulin und pro-MMP-9 Induktion darstellt. Die pro-MMP-9 Induktion durch Insulin in humanen THP-1 Monozyten nach 24h Inkubation ist ab einer Konzentration von 0.1 nmol/L Insulin signifikant. HT1080 (HT)=Standart. **8. B:** Densitometrierte pro-MMP-9 Daten aus n=4 Versuchen. Ab einer Konzentration von 0.1 nmol/L Insulin ist die pro-MMP-9 Synthese signifikant (* $p < 0,05$ vs. Ko) verglichen zur unstimulierten Kontrolle (Ko).

Neben der konzentrationsabhängigen MMP-9 Induktion durch Insulin, die in der Gelatin-Zymographie dargestellt wurde, sollte diese auch auf Proteinebene untersucht werden. Hierbei zeigte der Western Blot nach 16-stündiger Synchronisation (0 % FKS) der THP-1 Monozyten und darauf folgender 24-stündiger Insulinstimulation die isolierten zellulären Proteine der THP-1 Monozyten. Die verwendeten Konzentrationen der Insulinstimulation betragen 1, 10, 25, 50, 100 und 250 nmol/L.

Ab einer Konzentration von 1 nmol/L Insulin konnte ein signifikantes Signal von pro-MMP-9 Proteinen detektiert werden, welches mit steigender Insulinkonzentration zunahm (Abbildung 9).

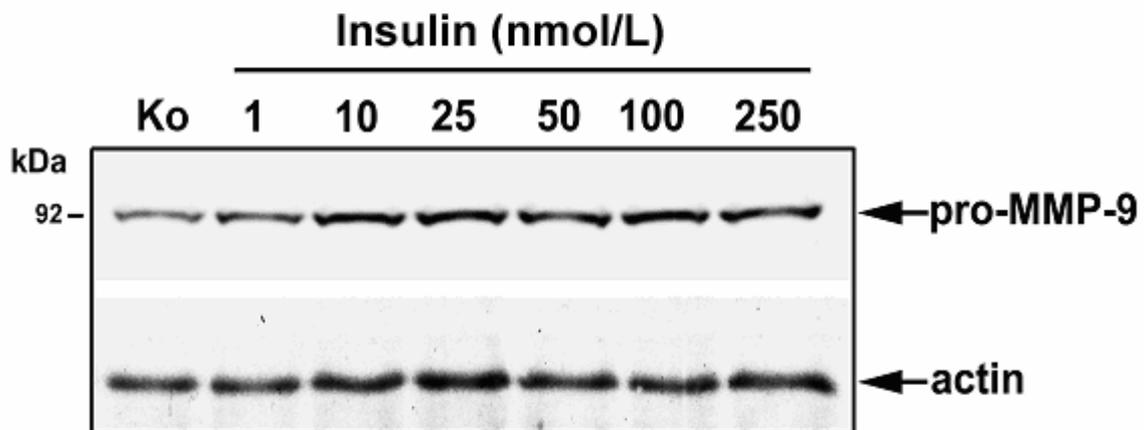


Abbildung 9: Exemplarischer Western Blot mit Darstellung der Konzentrationsabhängigkeit (1, 10, 25, 50, 100, 250 nmol/L Insulin) von pro-MMP-9 nach Stimulation von humanen THP-1 Monozyten mit Insulin über 24 h. Der Western Blot wurde mit Aktin (actin) nochmals zur Proteinladungskontrolle geblottet. (n=3)

Weiterhin wurden Versuche zur Zeitabhängigkeit zwischen Insulin und der pro-MMP-9 Induktion durchgeführt. Nach 16-stündiger Synchronisation (0 % FKS) und Stimulation der THP-1 Monozyten mit 10 nmol/L Insulin wurden nach den festgesetzten Zeiten: 2, 4, 6, 12, 24, 48 Stunden die zellfreien Überstände abgenommen und in der Gelatin-Zymographie analysiert. Um eine stabile Stimulation von pro-MMP-9 zu gewährleisten, wurde die Konzentration von 10 nmol/L Insulin gewählt, welche zuvor in den Konzentrationsversuchen bestimmt worden war. Die Kontrolle wurde nach der Synchronisation nicht mit Insulin stimuliert. Diese zellfreien Überstände wurden nach 48 Stunden isoliert.

In Abbildung 10.A ist exemplarisch eine Gelatin-Zymographie dargestellt. Nach einer Stimulationszeit von 12 Stunden mit 10 nmol/L Insulin war eine signifikante pro-MMP-9 Induktion detektierbar ($p < 0,05$ vs. Kontrolle). Dieses deutlich kontinuierlich steigende Signal in der Gelatin-Zymographie zeigte sich bis zu einer Stimulationszeit von 48 h. Pro-MMP-2 zeigte keine zeitabhängige Regulation durch Insulin.

Die densitometrierten Daten aus vier unabhängigen Gelatin-Zymographie wurden gemittelt und auf die Kontrolle (100 %) normalisiert (Abb. 10.B).

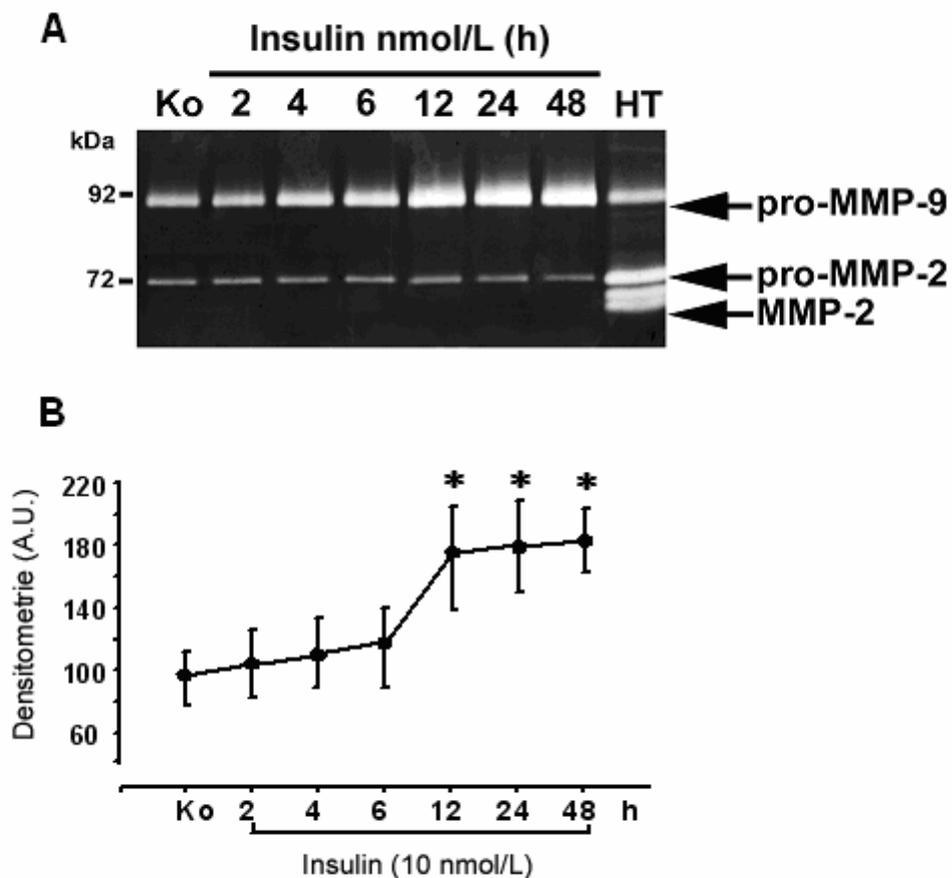


Abbildung 10. A: Exemplarische Gelatin-Zymographie der zeitabhängigen pro-MMP-9 Induktion nach 2, 4, 6, 12, 24, 48 h durch 10 nmol/L Insulin in THP-1 Monozyten. HT1080 (HT)=Standart **10. B:** Densitometrierte und gemittelte pro-MMP-9 Daten aus vier unabhängigen Versuchen. Nach einer Inkubationszeit von 12 h mit 10 nmol/L Insulin ist die pro-MMP-9 Induktion signifikant (* $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle (Ko)). $n=4$.

4.4. Die Bedeutung des Insulinrezeptors bei der MMP-9 Induktion durch Insulin in THP-1 Monozyten

Da eine signifikante Induktion von Insulin auf pro-MMP-9 in humanen THP-1 Monozyten in den vorangegangenen Experimenten gezeigt werden konnte, die zeit- und konzentrationsabhängige war, untersuchten wir nachfolgend hierzu die Bedeutung des Insulinrezeptors. Zunächst untersuchten wir die Expression des Insulinrezeptors auf humanen THP-1 Monozyten. Dazu verwendeten wir die Methode der FACS-Analyse.

Hierzu wurden 200.000 THP-1 Monozyten pro Probe mit einem Fluoreszenzmarkierten Antikörper, welcher spezifisch für die α -Untereinheit des Insulinrezeptors ist, inkubiert und im Durchflusszytometer gemessen. Als Kontrolle wurde der Isotypenantikörper (Maus IgG1) benutzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 in Form eines exemplarischen Histogramms dargestellt.

Dabei zeigte sich für die mit dem Isotypenantikörper inkubierten THP-1 Monozyten eine geringe Hintergrundfluoreszenz (durchgezogene Linie), im Gegensatz zu den THP-1 Monozyten, die mit dem Insulinrezeptorantikörper (gestrichelte Linie) inkubiert wurden. Es war ein signifikanter Unterschied zwischen Isotypen- und Insulinrezeptorantikörper im Fluoreszenzsignal nachzuweisen. Somit exprimieren THP-1 Monozyten den Insulinrezeptor signifikant auf ihrer Zellmembran.

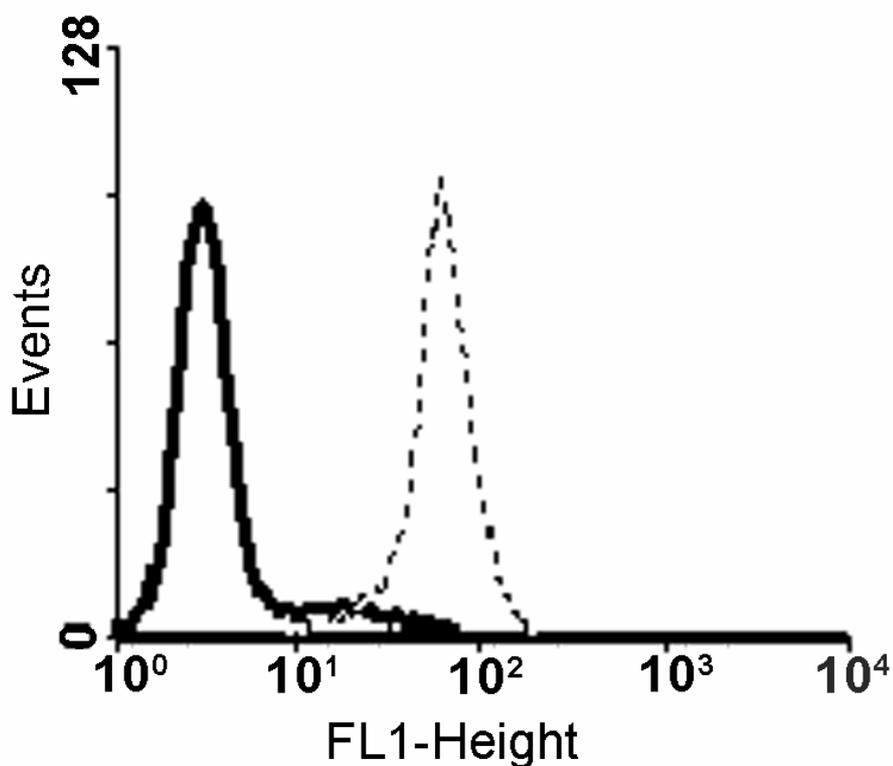


Abbildung 11: Das exemplarische Histogramm der FACS-Analyse zeigt die Insulinrezeptorexpression auf THP-1 Monozyten. Die durchgezogene Linie stellt die THP-1 Monozyten dar, die mit einem Isotypenantikörper (Maus IgG1) inkubiert wurden. Die gestrichelte Linie stellt die THP-1 Monozyten dar, die mit einem Insulinrezeptorantikörper (gerichtet gegen die α -Untereinheit des Insulinrezeptors) inkubiert wurden. Bei ca. 100000 Events zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Signalfluoreszenz der beiden Antikörper. (n=3).

Um weiter die Funktion des Insulinrezeptors in der Induktion von pro-MMP-9 durch Insulin zu analysieren, wurde nachfolgend die Insulinrezeptoraktivierung inhibiert. Der Insulinrezeptor, als Proprotein synthetisiert, benötigt eine endoproteolytische Aktivierung durch die Proprotein Convertase Furin, um als transmembranöses heterotetrameres Protein aus Disulfid-gebundenen $\alpha 2/\beta 2$ Ketten synthetisiert zu werden (Alarcon, Cheatham et al. 1994). Decanoyl-RVKR-chloromethylketone (Dec-CMK), ein spezifisch pharmakologischer Inhibitor der Proprotein Convertase Furin (Hallenberger, Bosch et al. 1992), sollte die Aktivierung der Insulinrezeptoren in THP-1 Monozyten hemmen und somit die durch Insulin vermittelte pro-MMP-9 Induktion reduzieren.

Zunächst untersuchten wir daher, ob die Proprotein Convertase Furin von THP-1 Monozyten exprimiert wird. Hierzu wurde ebenso die Methode der FACS-Analyse verwendet.

Dazu wurden 200.000 THP-1 Monozyten pro Probe mit einem Fluoreszenzmarkierten Antikörper inkubiert, welcher spezifisch für Furin ist. Als Kontrolle diente der entsprechende Isotypenantikörper (Kaninchen IgG). Mittels Durchflusszytometrie wurden dann die Fluoreszenzen der Proben analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 in Form eines exemplarischen Histogramms dargestellt.

Dabei zeigte sich für die mit dem Isotypenantikörper inkubierten THP-1 Monozyten eine geringe Hintergrundfluoreszenz (durchgezogene Linie), im Gegensatz zu den THP-1 Monozyten, die mit dem Furinrezeptorantikörper (gestrichelte Linie) inkubiert wurden. Es war ein signifikanter Unterschied zwischen Isotypen- und Furinrezeptorantikörper im Fluoreszenzsignal nachzuweisen. Somit stellte sich die Expression von Furin auf THP-1 Monozyten dar.

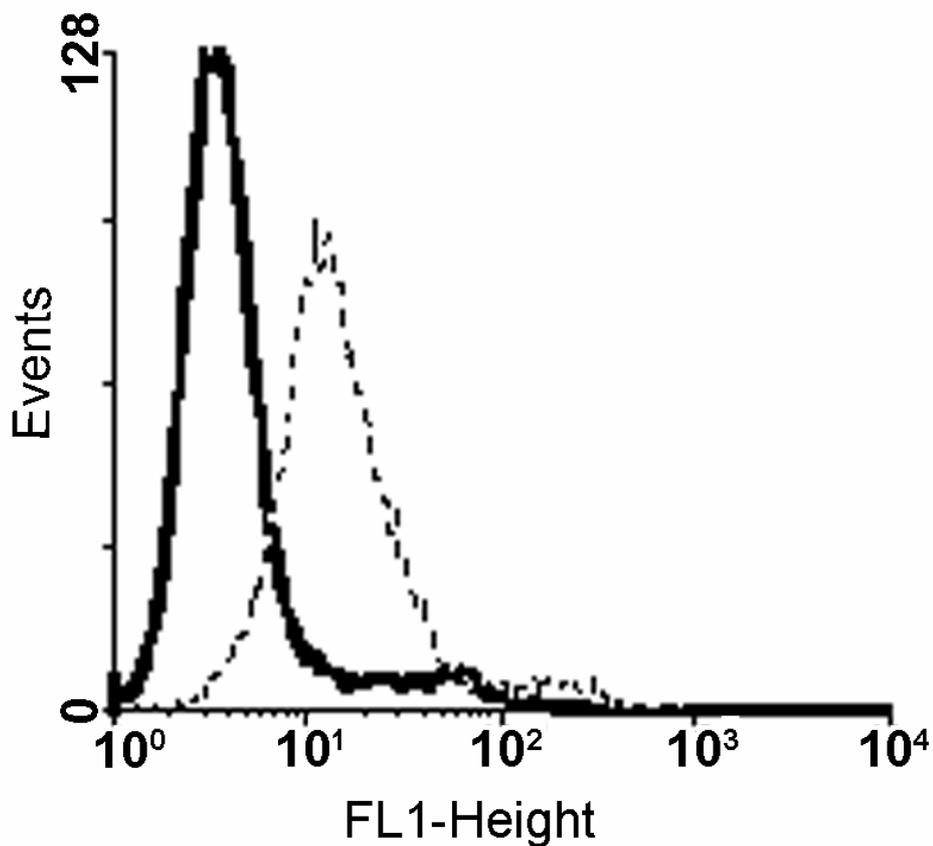


Abbildung 12: Das exemplarische Histogramm der FACS-Analyse zeigt die Furinexpression auf THP-1 Monozyten. Die durchgezogene Linie stellt die THP-1 Monozyten dar, welche mit einem Isotypenantikörper (Kaninchen IgG) inkubiert wurden. Die gestrichelte Linie stellt die THP-1 Monozyten dar, die mit dem spezifischen Furinantikörper inkubiert wurden. Bei über 100000 Events zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Signalfluoreszenz der beiden Antikörper. ($n=3$).

Nachfolgend untersuchten wir, welchen Effekt die Inhibition von Furin durch dec-CMK auf die endoproteolytische Aktivierung des Insulinrezeptors in THP-1 Monozyten hat. Dazu wurden über 16 Stunden synchronisierte (0 % FKS) THP-1 Monozyten über Nacht mit 50 $\mu\text{mol/L}$ dec-CMK inkubiert. Als Kontrolle wurden synchronisierte THP-1 Monozyten über dieselbe Zeit ohne den Inhibitor inkubiert. Anschließend wurden die zellulären Proteine isoliert, so dass im Western Blot der Insulinrezeptor analysiert werden konnte. Hierzu nutzten wir einen spezifischen Antikörper gegen die β -Untereinheit des Insulinrezeptors (Abbildung 13).

Abbildung 13 zeigt exemplarisch einen Western Blot. Die Kontrolle (ohne dec-CMK) lässt bei 100 kDa die Bande der β -Untereinheit des endoproteolytisch aktivierten Insulinrezeptors erkennen. Die bei 200 kDa erkenntliche Bande, welche die nicht aktivierte α - und β -Untereinheiten des Insulinrezeptors darstellt (Propeptidform des Insulinrezeptors im endoplasmatischen Retikulum), ist schwach nachzuweisen.

Im Vergleich zur Kontrolle konnte gezeigt werden, dass durch die Inkubation mit dec-CMK und damit der Hemmung von Furin die endoproteolytisch aktivierte β -Untereinheit des Insulinrezeptors bei 100 kDa deutlich schwächer ausgeprägt war, hingegen die nicht aktivierte *trans*-Golgi Netzwerk (TGN) Proform deutlich verstärkt exprimiert war. Somit wurde durch die Inkubation der THP-1 Monozyten mit dec-CMK die endoproteolytische Aktivierung des Insulinrezeptors, demonstriert durch das Auftreten der nicht aktivierten *trans*-Golgi Netzwerk Proform (TGN) bei 210 kDa und durch das verringerte Signal der aktivierten Insulinrezeptoruntereinheit β 100 kDa, blockiert.

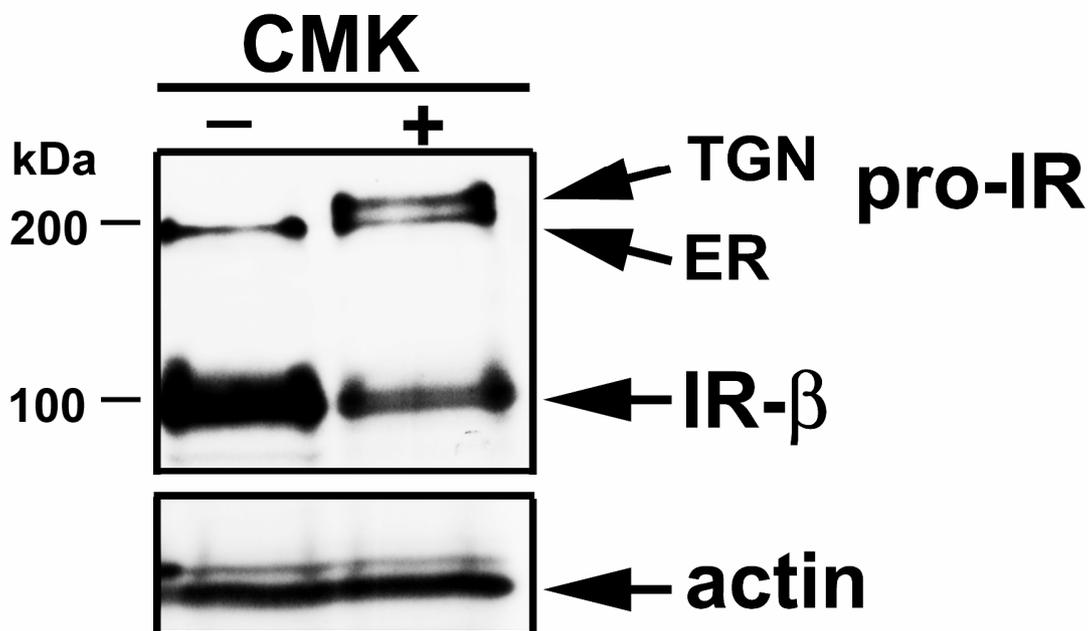


Abbildung 13: Exemplarischer Western Blot, welcher den Effekt der Inhibition von Furin durch dec-CMK auf die endoproteolytische Aktivierung des Insulinrezeptors in THP-1 Monozyten zeigt. Durch die Inhibition von Furin mit dec-CMK (50 $\mu\text{mol/L}$) wird die endoproteolytische Aktivierung des Insulinrezeptors gehemmt. In unbehandelten Kontrollen detektierte der Insulinrezeptorantikörper fast ausschließlich die aktivierte Insulinrezeptor- β -Untereinheit (IR- β ; 100 kDa), wohingegen die Inhibition von Furin mit dec-CMK die Insulinrezeptoraktivierung im trans-Golgi Netzwerk (TGN) hemmt. Neben der Propeptidform des Insulinrezeptors (pro-IR) im endoplasmatischen Retikulum (ER) ist die TGN bei 210 kDa vermehrt nach der Inhibition mit Furin darstellbar. Gleichzeitig ist die Expression der β -Untereinheit des Insulinrezeptors (IR- β) verringert. Der Western Blot ist zur Ladungskontrolle nochmals mit Aktin (actin) geblottet. $n=3$.

In vorhergehenden Versuchen zeigte sich, dass Furin zur endoproteolytischen Aktivierung des Insulinrezeptors in THP-1 Monozyten benötigt wird. Nun sollte der inhibitorische Effekt von dec-CMK auf Furin und damit auf die endoproteolytische Aktivierung des Insulinrezeptors zeigen, dass damit auch die durch Insulin vermittelte pro-MMP-9 Induktion vom Insulinrezeptor abhängig ist.

Es wurden über 16 Stunden synchronisierte (0 % FKS) THP-1 Monozyten über 16 Stunden mit dem spezifischen Furin Inhibitor dec-CMK vorinkubiert, bevor sie anschließend mit 10 nmol/L Insulin bzw. mit 10 ng/mL TNF- α stimuliert wurden. Zudem wurden unbehandelte Zellen inkubiert und jeweils zwei weitere Kontrollen, die mit 10 nmol/L Insulin oder 10 ng/mL TNF- α jedoch ohne eine Vorinkubation mit dec-CMK stimuliert wurden. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurden die zellfreien Überstände in der Gelatin-Zymographie analysiert (Abbildung 14).

Hierbei zeigte sich im Vergleich zu den unbehandelten Zellen eine signifikante Induktion von pro-MMP-9 sowohl durch Insulin als auch durch TNF- α (siehe auch Abb. 6.A). Weiter ist erkennbar, dass die Inhibition von Furin durch dec-CMK zu einer signifikanten Minderung des durch Insulin induzierten pro-MMP-9 Signals führte. Im Gegensatz dazu hatte die Inhibition durch dec-CMK keine Auswirkung auf die durch TNF- α induzierte Produktion von pro-MMP-9, da der TNF- α Rezeptor nicht durch Furin endoproteolytisch aktiviert wird. Die mit TNF- α und dec-CMK inkubierten Proben zeigten zudem, dass dec-CMK keinen Einfluss auf die Vitalität der humanen THP-1 Monozyten hatte. Somit ist ein aktivierter Insulinrezeptor essentiell für die Insulin vermittelte pro-MMP-9 Induktion.

Weiterhin waren keine Unterschiede im pro-MMP-2 Signal erkennbar.

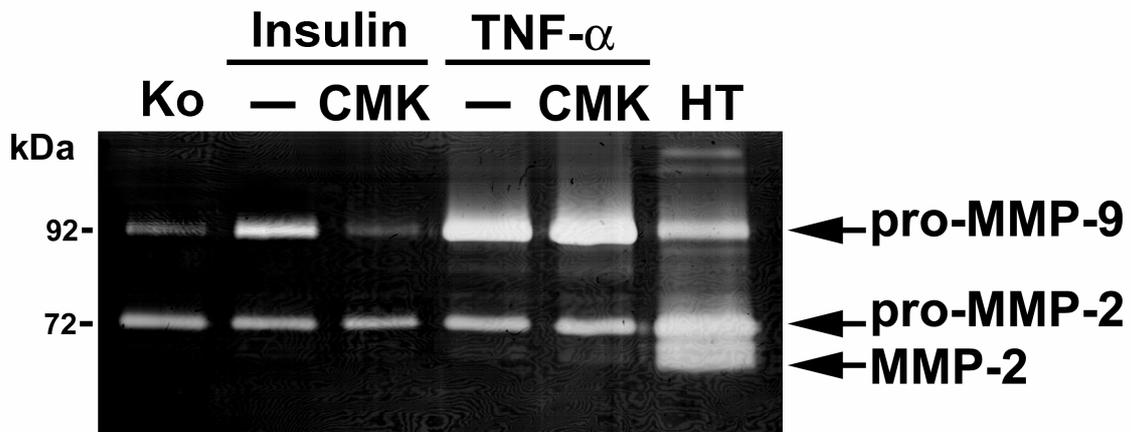


Abbildung 14: Exemplarische Gelatin-Zymographie, welche zeigt, dass die Inhibition der Furin-Convertase mit dec-CMK (50 $\mu\text{mol/L}$) einen deutlichen Einfluss auf die Insulin vermittelte pro-MMP-9 Induktion hat, jedoch nicht auf die durch TNF- α vermittelte pro-MMP-9 Induktion. HT1080 (HT) = Standard. $n=4$.

Da der Insulin- und der Insulin-like-growth-factor-Rezeptor (IGF-1 Rezeptor) nahezu identischen aufgebaut sind, untersuchten wir weiterhin die mögliche Beteiligung des IGF-1 Rezeptors in der Insulin induzierten pro-MMP-9 Expression. Beide Rezeptoren weisen in ihrer Aminosäuresequenz eine über 60 % Homologie im Bereich der Tyrosinkinasedomäne der β -Untereinheit auf (Ullrich, Gray et al. 1986). Insulin, als potentieller Ligand beider Rezeptoren, bindet unter physiologischen Konzentrationen mit hoher Affinität an den Insulinrezeptor. Jedoch bei erhöhten Konzentrationen (≥ 1 -5 nmol/L Insulin), die auch in unseren Experimenten genutzt wurden, ist nicht auszuschließen, dass Insulin an beide Rezeptoren bindet und Signalkaskaden induziert (Li, Barrett et al. 2005).

Ebenso wie der Insulinrezeptor wurde auch die Aktivierung des IGF-1 Rezeptors durch dec-CMK gehemmt (Stawowy, Kallisch et al. 2004). Deshalb sollte weiter differenziert werden, ob die Effekte durch Insulin auf pro-MMP-9 ausschließlich über den Insulinrezeptor vermittelt werden bzw. dass keine Effekte über den IGF-1-Rezeptor ausgelöst werden.

Um diese Fragestellung näher zu untersuchen, führten wir Versuche mit einem blockierenden IGF-1-Rezeptor Antikörper (IGF-1R α Antikörper; clone 1H7) durch (Cosaceanu, Budiu et al. 2007). Zunächst wurde die Spezifität des blockierenden IGF-1 Rezeptor Antikörpers anhand der Insulin abhängigen Proteinkinase B (Akt) Phosphorylierung untersucht um eine mögliche Bindung am Insulinrezeptor auszuschließen. Akt wurde in diesem Versuch anstatt der Mitogen-activated-protein-Kinase (MAPK) verwendet, da gezeigt werden konnten, dass IGF-1 die MAPK schwach stimuliert (Stawowy, Kallisch et al. 2004).

Von vier Ansätzen über 16 Stunden synchronisierter (0 % FKS) THP-1 Monozyten wurden je zwei mit 10 nmol/L Insulin und zwei mit 10 ng/mL IGF-1 über 20 Minuten stimuliert. Jeweils einer der beiden Ansätze wurde mit dem IGF-1R α blockierenden Antikörper (5 ng/mL) und der andere mit einem entsprechenden nicht immunen Isotypenantikörper (IgG, 5 ng/mL) 30 Minuten vorinkubiert. Zu diesen Ansätzen gab es jeweils eine Kontrolle, die nur mit Insulin bzw. mit IGF-1 stimuliert wurde. Nach der Stimulationszeit von 20 Minuten wurden die zellulären Proteine isoliert und die Phosphorylierung an Serin 473 von Akt mit einem spezifischen Antikörper (pAkt) im Western Blot analysiert (Abbildung 15).

In den Proben der mit Insulin stimulierten THP-1 Monozyten war kein signifikanter Unterschied in der Phosphorylierung von Akt zwischen dem Isotypenantikörper, dem blockierenden IGF-Rezeptor Antikörper und der Kontrolle zu beobachten. Alle drei Ansätze zeigten eine deutliche Phosphorylierung der Akt im Western Blot.

Different hierzu konnte nach IGF-1 Stimulation gezeigt werden, dass der IGF-1R α blockierende Antikörper die Phosphorylierung der Akt signifikant hemmte. Ohne den IGF-1 blockierenden Antikörper bzw. mit dem Isotypenantikörper wurde Akt deutlich durch IGF-1 phosphoryliert.

Zusammenfassend konnte der Western Blot in Abbildung 15 anhand der Phosphorylierung von Akt zeigen, dass der IGF-1R α blockierende Antikörper ein selektiv blockierender Antikörper für den IGF-Rezeptor ist, da er keinen Effekt auf die Insulin vermittelte Akt Induktion hatte.

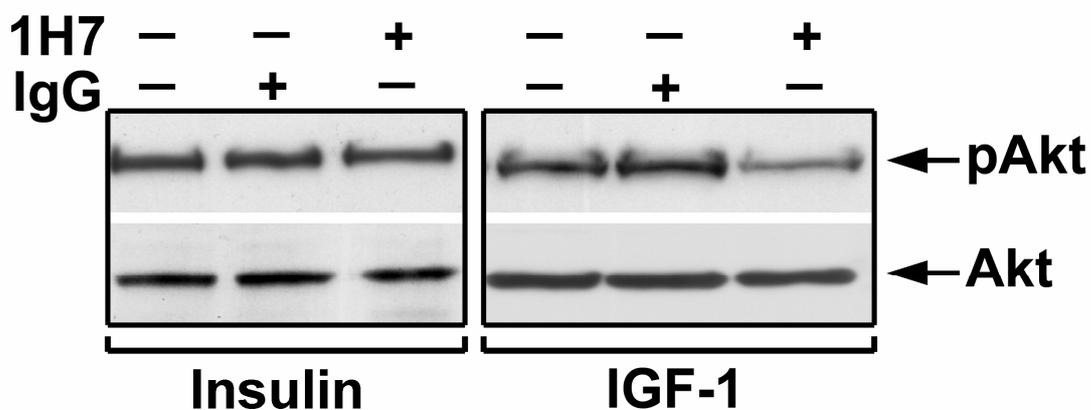


Abbildung 15: Exemplarischer Western Blot, welcher den Vergleich zwischen der Stimulierung mit 10 nmol/L Insulin und 10 ng/mL IGF-1 (jeweils 20 Minuten) auf die Phosphorylierung von Akt nach vorheriger Blockade mit einem blockierenden IGF-1R α Antikörper (clone 1H7, 5 ng/mL) zeigt. Nach 20 Minuten Stimulation mit 10 nmol/L Insulin und 10 ng/mL IGF-1 ist ein Signal der pAkt zu detektieren. Ausschließlich die Effekte von IGF-1 werden durch den blockierenden IGF-1R α (1H7) deutlich inhibiert. Der Kontrollantikörper (IgG, 5 ng/mL) zeigt keinen Effekt. Zur Proteinladungskontrolle sind die Membranen mit einem Antikörper gegen gesamt Akt nochmals geblottet. n=4.

Nachdem im vorangegangenen Versuch die Spezifität des blockierende IGF-Rezeptor Antikörpers für den IGF-Rezeptor nachgewiesen wurde, wurde im Weiteren untersucht, ob die durch Insulin induzierte pro-MMP-9 Synthese auch selektiv vom Insulinrezeptor abhängt.

Dazu wurden zellfreie Überstände von über 16 Stunden synchronisierten (0 % FKS) THP-1 Monozyten in der Gelatin-Zymographie verglichen, die zum einen nur mit 10 nmol/L Insulin für 24 Stunden stimuliert wurden, zum anderen vor der Insulinstimulierung (10 nmol/L, 24 h) mit 5 ng/mL IGF-1R α blockierende Antikörper (1H7) über 30 Minuten vorinkubiert wurden. Die Kontrolle wurde weder mit Insulin stimuliert noch mit dem blockierenden IGF-1R α Antikörper vorinkubiert.

In der Gelatin-Zymographie (Abbildung 16) zeigte sich keine signifikante Differenz zwischen den beiden mit Insulin stimulierten Ansätzen. Sowohl mit als auch ohne blockierenden IGF-Rezeptor Antikörper zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle das pro-MMP-9 Signal bei 92 kDa signifikant induziert. Dieses Ergebnis stützte die Hypothese, dass die Insulin abhängige pro-MMP-9 Induktion in THP-1 Monozyten hauptsächlich durch den Insulinrezeptor vermittelt wird.

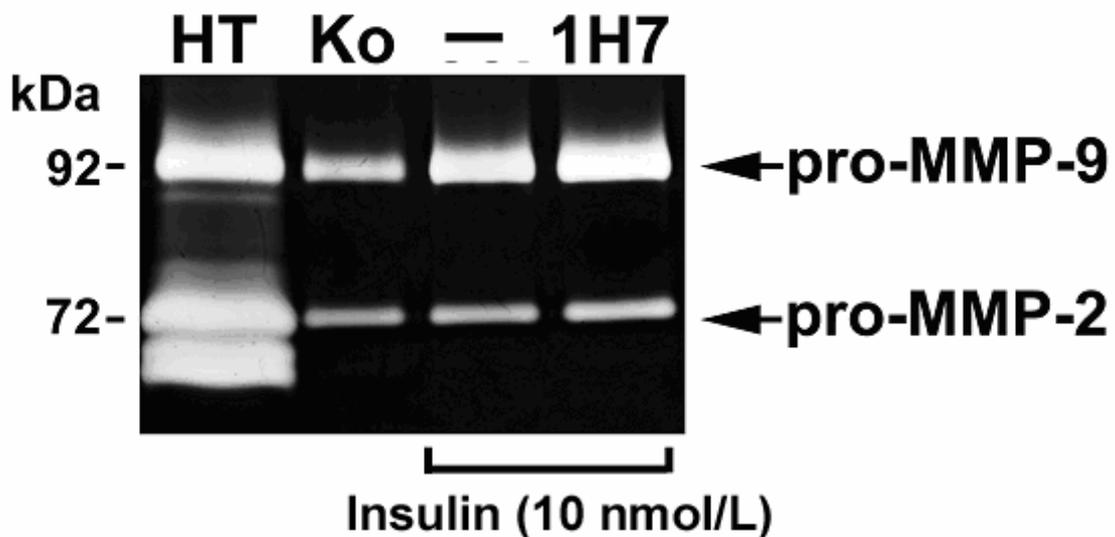


Abbildung 16: Exemplarische Gelatin-Zymographie, welche zeigt, dass die Insulin abhängige pro-MMP-9 Induktion in THP-1 Monozyten hauptsächlich durch den Insulinrezeptor vermittelt wird. Der 30 Minuten vor Insulinstimulation vorinkubierte, blockierenden IGF-1 Antikörper (1H7, 5 ng/mL) zeigt keinen signifikanten Effekt auf die Insulin (10 nmol/L, 24h) vermittelte pro-MMP-9 Induktion. Insulin zeigt die gleiche deutliche pro-MMP-9 Induktion nach Blockierung des IGF-1 Rezeptors. HT1080 (HT) = Standart. $n=4$.

4.5. Insulin induziert MMP-9 durch die Aktivierung der mitogenen Signaltransduktionskaskade

In den vorigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Insulin selektiv durch die Insulinrezeptorbindung pro-MMP-9 induziert. Weiter wollten wir untersuchen, welcher der beiden vom Insulinrezeptor abhängigen Signaltransduktionswege die pro-MMP-9 Induktion vermittelt.

Beide Signaltransduktionskaskaden werden durch Phosphorylierungen der Insulinrezeptorsubstrate (IRS) am Insulinrezeptor aktiviert. Die metabolische Signaltransduktionskaskade wird zentral über die PI3-Kinase vermittelt. Ist diese aktiviert, phosphoryliert sie die Proteinkinase B (Akt). Im Weiteren der Kaskade werden unter anderem die Glykogensynthetasekinase-3 (GSK-3) und die endotheliale Nitridoxidsynthetase (eNOs) phosphoryliert (Fang, Yu et al. 2000). Zudem führt die PI3-Kinase Kaskade zur Aktivierung der ribosomalen p70^{S6}-Kinase, dem entscheidenden in vivo Regulator des 40S ribosomalen Protein S6, wodurch Proteinsynthese und Zellzyklusprogression kontrolliert werden (Pullen and Thomas 1997; Vander Haar, Lee et al. 2007).

Neben der Aktivierung der PI3-Kinase durch die IRS-Proteine kann sich das Insulinsignal auf der Ebene der IRS-Proteine hin zum mitogenen Signaltransduktionsweg aufzweigen. Die Mitogen-activated-protein-Kinase (MAPK) Kaskade ist hier zentrales Glied unter weiteren Signaltransduktionsfaktoren, wie der C-Jun-amino-terminal-Kinasen (JNK) und p38.

Um die mitogene und metabolische Signaltransduktionskaskade zu differenzieren, benutzten wir spezifische pharmakologische Inhibitoren der einzelnen Signaltransduktionskaskaden. Zunächst untersuchten wir die Effekte von Wortmannin, einem spezifischen PI3-Kinase Inhibitor und PD98059, einem spezifischen Inhibitor der MAP-Kinase-Kinase (MEK). Hierzu wurden nach einer 16-stündigen Synchronisation (0 % FKS) der THP-1 Monozyten, diese mit den jeweiligen spezifischen Inhibitoren eine halbe Stunde vor der Stimulation mit Insulin (10 nmol/L; 24 Stunden) vorinkubiert.

Die zellfreien Überstände zeigten zunächst in der dargestellten Gelatin-Zymographie (Abbildung 17) die Induktion von pro-MMP-9 durch 10 nmol/L Insulin im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Die mit dem MEK Inhibitor PD98059 (15 μ mol/L) vorinkubierten Proben zeigten eine signifikante Verringerung des pro-MMP-9 Signals im Vergleich zur Insulin stimulierten Kontrolle. Der PI3-Kinase Inhibitor Wortmannin (50 nmol/L) hingegen hatte keinen inhibierenden Effekt auf das Insulin induzierte pro-MMP-9. Somit zeigte sich zunächst in der Abbildung 17 eine Abhängigkeit der pro-MMP-9 Produktion vom mitogenen Signaltransduktionsweg.

Im Gegensatz zu pro-MMP-9 zeigte pro-MMP-2 keine Änderungen durch die Inhibitoren PD98059 bzw. Wortmannin.

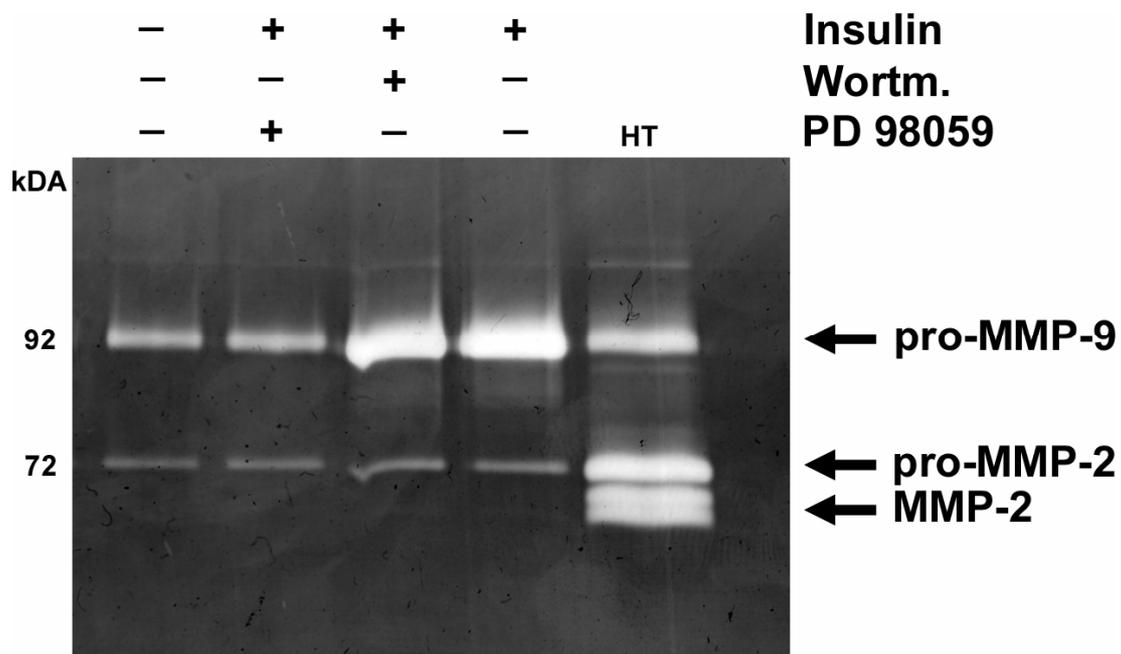


Abbildung 17: Exemplarische Gelatin-Zymographie, welche die unterschiedliche Funktion von mitogenem und metabolischem Signaltransduktionsweg bei der Insulin vermittelten pro-MMP-9 Induktion darstellt. Es zeigt sich in den zellfreien Überständen eine deutliche Abhängigkeit der Insulin (10 nmol/L; 24 Stunden) induzierten pro-MMP-9 Induktion vom mitogenen Signaltransduktionsweg, dargestellt durch den inhibierenden Effekt des MEK Inhibitors PD98059 (15 μ mol/L) auf pro-MMP-9. Der PI3-Kinase Inhibitor Wortmannin (Wortm. 50 nmol/L) zeigt keinen hemmenden Effekt auf die pro-MMP-9 Synthese. HT1080 (HT) = Standard. n=4.

Um die Spezifität der pharmakologischen Inhibitoren PD98059 und Wortmannin für die einzelnen Signaltransduktionsfaktoren zu überprüfen, wurden die Phosphorylierungen der Zielproteine anhand von Western Blots untersucht. Hierzu wurden nach einer 16-stündigen Synchronisation (0 % FKS) der THP-1 Monozyten, diese mit den jeweiligen spezifischen Inhibitoren eine halbe Stunde vor der Stimulation mit Insulin (10 nmol/L) vorinkubiert. Die Proteine der THP-1 Monozyten wurden 20 Minuten nach Stimulierung mit 10 nmol/L Insulin isoliert und im Western Blot untersucht (Abbildung 18).

Mit den jeweiligen spezifischen Antikörpern konnte nachgewiesen werden, dass die durch die pharmakologischen Inhibitoren inhibierten zellulären Proteine in THP-1 Monozyten exprimiert sind und diese im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen durch 10 nmol/L Insulin aktiviert wurden. Im Western Blot wurden die von der MEK aktivierte ERK1/2 (pERK1/2) in der mitogenen Signaltransduktionskaskade, sowie in der metabolischen Signaltransduktionskaskade die durch Phosphorylierungen aktivierte Formen von Akt (pAkt), eNOs (p-eNOs), GSK-3 α / -3 β (pGSK-3 α / -3 β) untersucht. Zudem wurde das inaktive Gesamtprotein GSK-3 zur Proteinladungskontrolle mit einem spezifischen Antikörper nochmals geblottet.

Anhand dieser Signaltransduktionsfaktoren wurde gezeigt, dass 50 nmol/L Wortmannin die Phosphorylierung durch 10 nmol/L Insulin und damit die Aktivierung der Protein Kinase B (Akt) inhibiert und die nachfolgenden Signaltransduktionsfaktoren eNOs und GSK-3 α / -3 β nicht aktiviert werden. Es zeigte sich jedoch keine Inhibition der aktivierten phosphorylierten Formen von ERK1/2 (pERK1/2), welches die Spezifität von 50 nmol/L Wortmannin für die metabolische Signaltransduktionskaskade deutlich machte.

Die Inhibition durch 15 μ mol/L PD98059 zeigte, dass nur die phosphorylierten Formen von ERK1/2 (pERK1/2) gehemmt wurden. Auf die PI3-Kinase und damit auf die phosphorylierten Signaltransduktionsfaktoren pAkt, p-eNOs, p-GSK-3 α / -3 β der metabolischen Signaltransduktion hatte PD98059 keinen Einfluss. Dies zeigte die Spezifität des MEK Inhibitors PD98059 (15 μ mol/L) für die mitogene Signaltransduktionskaskade.

Die Kontrollen die weder mit Insulin noch mit den Inhibitoren inkubiert wurden, zeigten keine Phosphorylierungen der untersuchten zellulären Proteinen (ERK1, ERK2, Akt, eNOs, GSK-3).

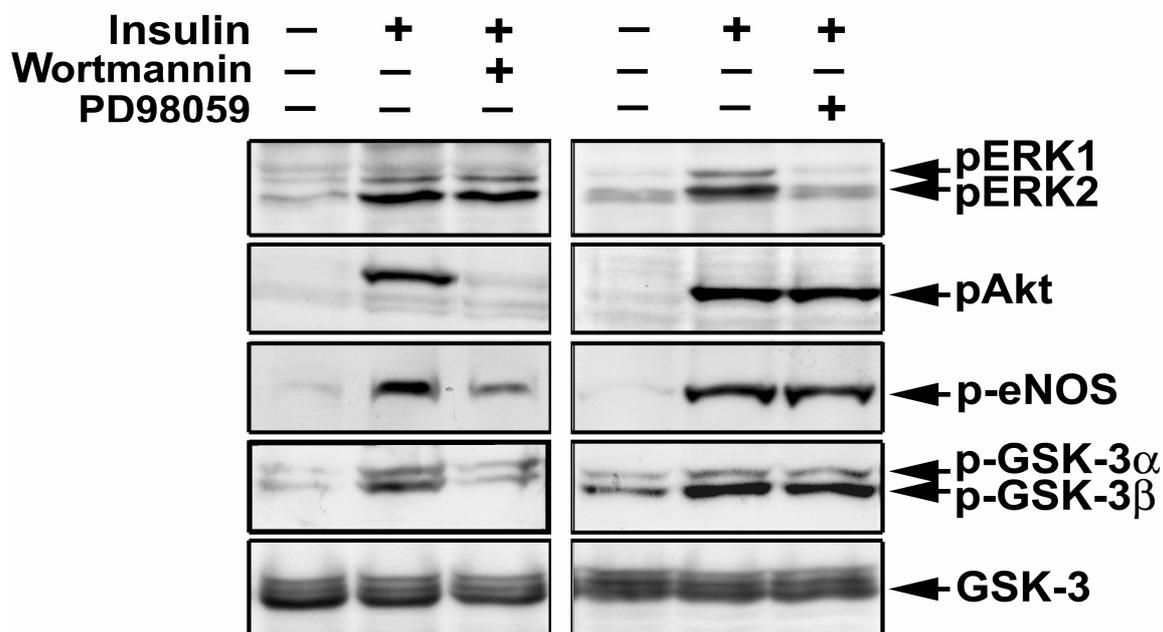


Abbildung 18: Exemplarischer Western Blot, welcher die Spezifität der pharmakologischen Inhibitoren Wortmannin (50 nmol/L) und PD98059 (15 μ mol/L) darstellt. Wortmannin inhibiert ausschließlich die phosphorylierten Formen der metabolischen Signaltransduktionsfaktoren (pAkt, p-eNOS, p-GSK-3 α /-3 β). PD98059 hingegen inhibiert nur die Phosphorylierung der mitogenen Signaltransduktionsfaktoren (pERK1/2). Eine Kontrolle ohne Insulinstimulierung und Inhibitorinkubierung zeigt keine Phosphorylierungen an den betrachteten Signaltransduktionsfaktoren. Zur Proteinladungskontrolle sind die Western Blot Membranen mit einem Antikörper gegen das Gesamtprotein GSK-3 nochmals geblottet. n=4.

In dem vorherigen Versuch wurde gezeigt, dass Wortmannin, ein Inhibitor des metabolischen Signaltransduktionsweges am Insulinrezeptor, keinen inhibitorischen Effekt auf die Insulin vermittelte pro-MMP-9 Induktion hat, jedoch die Komponenten des Signalings in ihrer Phosphorylierung zu hemmen vermochte. Dieses versuchten wir mit zwei weiteren pharmakologischen Inhibitoren (LY294002 und Rapamycin) des metabolischen Signalings zu bestätigen. LY294002 ist ein Inhibitor der PI3-Kinase, Rapamycin der mTOR/p70^{S6}.

Dazu wurden über 16 Stunden synchronisierte (0 % FKS) THP-1 Monozyten 30 Minuten mit dem jeweiligen Inhibitor vorinkubiert (50 nmol/L Wortmannin; 2,5 µmol/L LY294002; 100 ng/mL Rapamycin) und anschließend mit 10 nmol/L Insulin über 12 Stunden stimuliert. Die zellfreien Überstände wurden mittels Gelatin-Zymographie (Abbildung 19.A) und die isolierten Proteine mittels Western Blot (Abbildung 19.B) analysiert.

In der Gelatin-Zymographie induzierte 10 nmol/L Insulin signifikant pro-MMP-9 nach 24 Stunden im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Keiner der eingesetzten Inhibitoren konnte eine signifikante Hemmung dieses durch Insulin induzierten pro-MMP-9 Signals zeigen. Die inaktive Kontrolle (2,5 µmol/L LY303511) von LY294002, welche die gleiche Struktur besitzt wie LY294002 selbst und Rapamycin zeigten keinen Effekt.

Im Western Blot zeigte sich die Spezifität der Inhibitoren an Hand der Phosphorylierung der jeweiligen betrachteten Proteine, pAkt und (p)p70^{S6}, wobei die Gesamtheit des Proteins Akt die Gleichmäßigkeit der jeweiligen Proben widerspiegelte. Wortmannin und LY294002 hemmten die Aktivierung von Akt und p70^{S6} zu ihren phosphorylierten Formen pAkt und phospho-p70^{S6}. Die Negativkontrolle LY303511 hatte keinen inhibierenden Effekt auf die Phosphorylierungen. Rapamycin zeigte eine Inhibition der Phosphorylierung von p70^{S6}, jedoch nicht von pAkt.

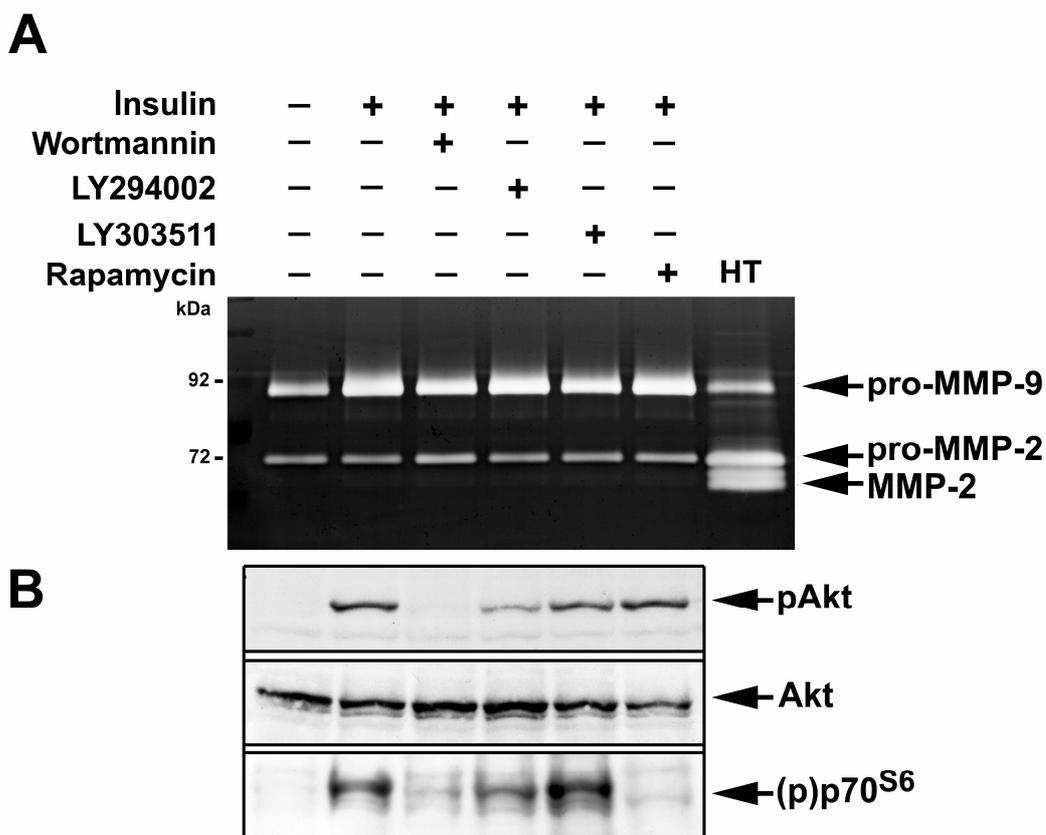


Abbildung 19. A, B: Darstellung ausgewählter spezifischer pharmakologischer Inhibitoren der metabolischen Signaltransduktion des Insulinrezeptors in der Gelatin-Zymographie (A) und im Western Blot (B). In der exemplarischen Gelatin-Zymographie zeigen die PI3-Kinase Inhibitoren Wortmannin (50 nmol/L) und LY294002 (2,5 μ mol/L) keine Effekt auf das durch Insulin (10 nmol/L; 12h) induzierte pro-MMP-9. LY303511 (2,5 μ mol/L), als Negativkontrolle verwendet, und Rapamycin (100 ng/mL), ein Inhibitor der mTOR/p70^{S6}, haben ebenso keinen Effekte auf das pro-MMP-9 Signal. HT1080 (HT) = Standart. $n=4$. Im exemplarischen Western Blot kann anhand der phosphorylierten Proteinen (pAkt, (p)p70^{S6}) die spezifische Inhibition durch die pharmakologischen Inhibitoren nachgewiesen werden. Wortmannin und LY294002 inhibieren signifikant pAkt und (p)p70^{S6}, hingegen die Negativkontrolle LY303511 nicht. Rapamycin inhibiert signifikant (p)p70^{S6}. Zur Ladungskontrolle sind die Western Blot Membranen mit einem Antikörper gegen das Gesamtprotein Akt nochmals geblottet. $n=3$.

Um die Bedeutung der mitogenen Signaltransduktion in der Insulin vermittelten pro-MMP-9 Induktion differenzierter untersuchen, wurden Experimente mit weiteren pharmakologischen Inhibitoren durchgeführt. Dazu wurden, zusätzlich zu dem oben verwendeten Inhibitor PD98059, U0126 sowie seine inaktive Kontrolle U0124 und SB203580 verwendet. U0126 inhibiert spezifisch die Aktivierung von ERK1/2. SB203580 ist ein spezifischer p38 MAP-Kinase Inhibitor. Diese Inhibitoren wurden jeweils 30 Minuten vor der 12-stündigen Insulinstimulierung inkubiert. Zudem gab es eine Kontrolle ohne Insulinstimulation und ohne pharmakologische Inhibition. Die zellfreien Überstände wurden nach Ablauf der Stimulationszeit in der Gelatin-Zymographie (Abbildung 20.A), die isolierten Proteine im Western Blot (Abbildung 20.B) analysiert.

Ebenso wie der MEK Inhibitor PD98059 (15 $\mu\text{mol/L}$), hemmte auch U0126 (2 $\mu\text{mol/L}$) die Insulin vermittelte pro-MMP-9 Induktion. Zusätzlich zeigte die inaktive Kontrolle U0124 in gleicher Konzentration verwendet wie U0126 keinen Effekt auf pro-MMP-9. Der Inhibitor p38 Inhibitor SB203580 (2,5 $\mu\text{mol/L}$) zeigte keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur nur mit Insulin stimulierten Kontrolle, die selber im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle eine Induktion von pro-MMP-9 durch 10 nmol/L Insulin zeigte.

Die Spezifität der pharmakologischen Inhibitoren wurde mit Hilfe von Western Blots (Abbildung 20.B) und dem Einsatz von spezifischen Antikörpern gegen ausgewählte Proteine der Signaltransduktion überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibitoren PD98059 und U0126 die Aktivierung der Proteine ERK1/2 hemmen, so dass keine phosphorylierten Formen (pERK1/2) im Western Blot zu erkennen war. SB203580 inhibierte ausschließlich die Phosphorylierung des Proteins p38 und hatte keinen Einfluss auf die Aktivierung von ERK1/2. Das Signal der Gesamtproteine von ERK1/2 und p38 waren in den aufgetragenen Western Blots in den jeweiligen Proben gleicher Ausprägung und konnten als Ladungskontrolle gelten.

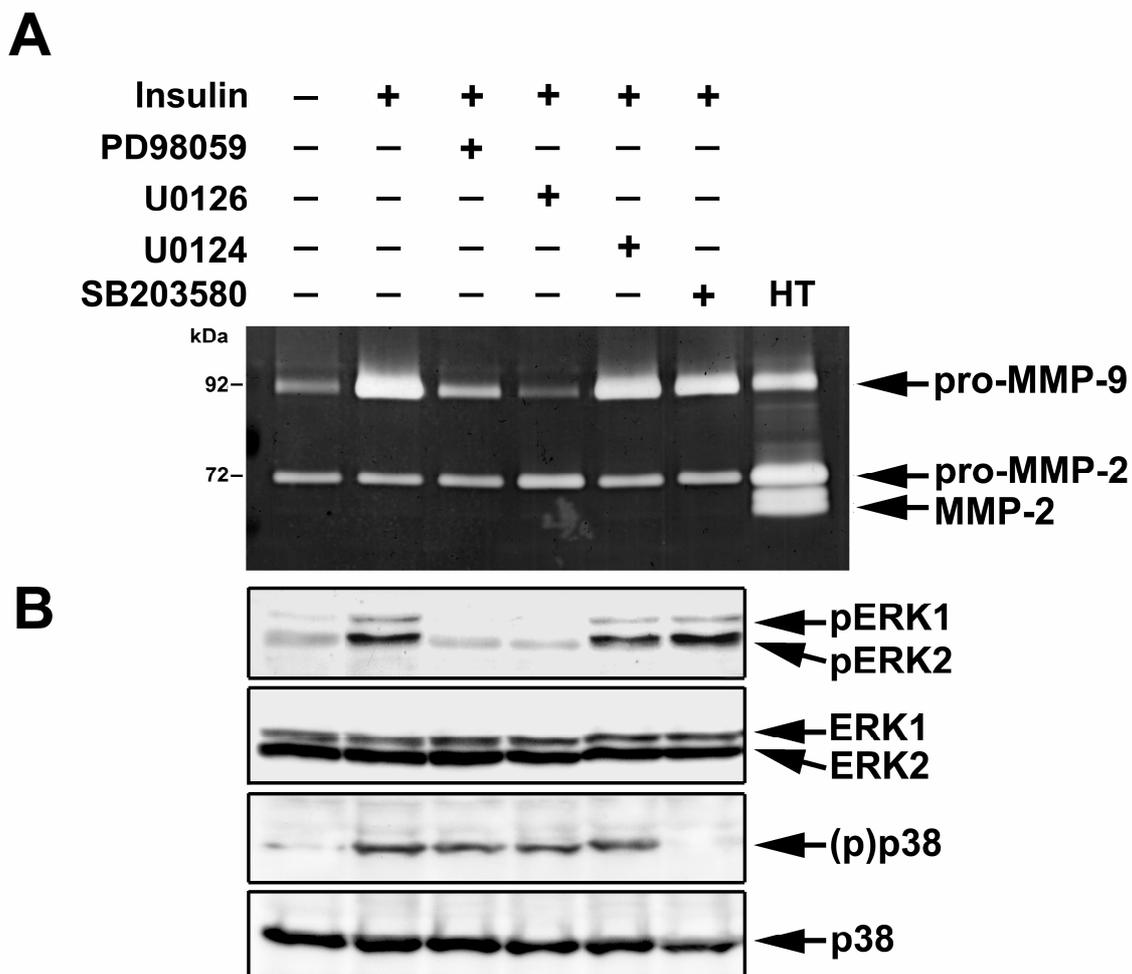


Abbildung 20. A, B: Darstellung ausgewählter spezifischer Inhibitoren der mitogenen Signaltransduktion des Insulinrezeptors mittels Gelatin-Zymographie (A) und Western Blot (B). Die ERK1/2-Inhibitoren PD98059 (15 $\mu\text{mol/L}$) und U0126 (2 $\mu\text{mol/L}$) zeigen in der exemplarischen Gelatin-Zymographie eine signifikante Verringerung des Insulin (10 nmol/L; 12 h) vermittelten pro-MMP-9 Signals, wobei die Negativkontrolle der ERK1/2-Inhibitoren U0124 (2 $\mu\text{mol/L}$) und der p38 MAP-Kinase Inhibitor SB203580 (2,5 $\mu\text{mol/L}$) keinen Effekt zeigen. HT1080 (HT) = Standard. $n=4$. Im exemplarischen Western Blot zeigt sich eine Inhibition der phosphorylierten Proteine pERK1/2 durch PD98059 (15 $\mu\text{mol/L}$) und U0126 (2 $\mu\text{mol/L}$), hingegen nicht durch die inaktive Kontrolle U0124 (2 $\mu\text{mol/L}$). Der Inhibitor SB203580 (2,5 $\mu\text{mol/L}$) inhibierte die Phosphorylierung des Proteins p38. Die Membranen des Western Blots sind zur Ladungskontrolle mit einem Antikörper gegen die Gesamtproteine ERK1/2 und p38 nochmals geblottet. $n=4$.

Weiterführend wurde mit dem pharmakologischen Inhibitor U0126 eine Konzentrationsreihe durchgeführt, die den negativen Effekt auf das Insulin vermittelte pro-MMP-9 und damit die Abhängigkeit der mitogenen Signaltransduktionskaskade verdeutlichen sollte.

Hierzu wurden verschiedene Konzentrationen des Inhibitors U0126 benutzt. Mit diesen wurden 16-stündig synchronisierte (0 % FKS) THP-1 Monozyten 30 Minuten vorinkubiert und anschließend mit 10 nmol/L Insulin stimuliert. Mit Hilfe der Gelatin-Zymographie wurden die zellfreien Überstände nach 24 Stunden Inkubation analysiert (Abbildung 21).

In der Gelatin-Zymographie zeigte sich eine Konzentrationsabhängigkeit des Inhibitors, wobei ab einer Konzentration von 0,1 $\mu\text{mol/L}$ eine signifikante Inhibition der Insulin vermittelten pro-MMP-9 Induktion in THP-1 Monozyten zu messen war, welche sich mit steigender U0126 Konzentration verstärken ließ.

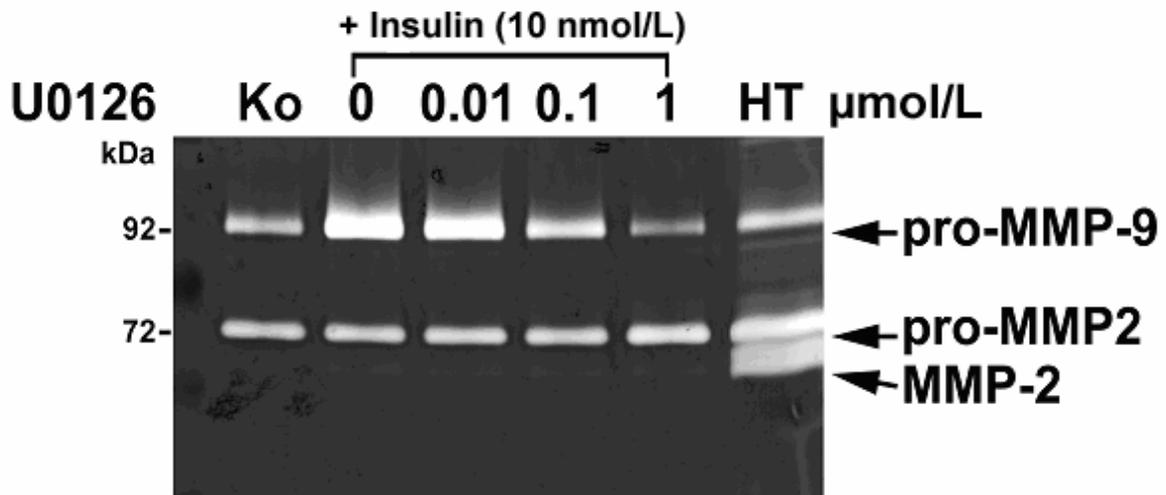


Abbildung 21: Exemplarische Gelatin-Zymographie der dosisabhängigen Inhibition des durch Insulin vermittelten pro-MMP-9 Signals durch U0126, einem MEK1/2 Inhibitor. U0126 inhibiert die Insulin vermittelte pro-MMP-9 Induktion ab einer Konzentration von 0,1 µmol/L deutlich. HT1080 (HT) = Standard. n=4.

4.6. Insulin induziert MMP-9 in THP-1 Monozyten durch translationale und transkriptionelle Mechanismen

Nach Darstellung der Abhängigkeit der mitogenen Signaltransduktionskaskade in der Insulin abhängigen pro-MMP-9 Induktion untersuchten wir weiterhin, ob transkriptionelle oder translationale Mechanismen in der Insulin vermittelten pro-MMP-9 Sekretion beteiligt sind. Hierzu nutzten wir die Inhibitoren Cycloheximide und Actinomycin D. Actinomycin D ist ein Inhibitor der Gentranskription und hemmt die DNA-abhängige RNA-Biosynthese (Chen, Liu et al. 1996). Cycloheximide hemmt die Translokaseaktivität der Ribosomen und greift somit in der Translation ein (Fulda, Meyer et al. 2000).

Zunächst wurden THP-1 Monozyten über 16 Stunden synchronisiert (0 % FKS), welche dann mit jeweils zwei verschiedenen Konzentrationen Actinomycin D (0,5, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) oder Cycloheximide (0,5, 1 nmol/L) 30 Minuten vorinkubiert wurden, bevor sie anschließend für 24 Stunden mit 10 nmol/L Insulin stimuliert wurden. Des Weiteren wurden eine Kontrolle (Ko1) ohne Insulinstimulierung und Inhibitor sowie eine weitere Positivkontrolle mit Insulinstimulierung jedoch ohne einen Inhibitor (Ko2) angesetzt. Nach Ablauf der Versuchszeit wurden die zellfreien Überstände isoliert und in der Gelatin-Zymographie analysiert (Abbildung 22.A). Der Inhibitor Actinomycin D hemmte die pro-MMP-9 Synthese in der zymographischen Darstellung signifikant ab einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ – der Inhibitor Cycloheximide ab einer Konzentration von 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Abbildung 22.B stellt die Densitometrie der pro-MMP-9 Bande dar, gemittelt aus vier unabhängigen Versuchsansätzen. Hierbei zeigte die Vorinkubation mit Cycloheximide für 30 Minuten ein verringertes pro-MMP-9 Signal nach einem Konzentrationsabhängigen Muster. Eine Konzentration von 0,5 nmol/L verringerte das pro-MMP-9 Signal um $47 \pm 7 \%$, und eine Konzentration von 1 nmol/L verringerte das Signal um $53 \pm 3\%$. Actinomycin D zeigte bei einer Konzentration von 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ eine um $13 \pm 6 \%$ nicht signifikante Inhibition. Eine Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Actinomycin D zeigte eine signifikante Inhibition von $45 \pm 4\%$.

Sowohl Actinomycin als auch Cycloheximide zeigten eine Inhibition des pro-MMP-9 Signals und bestätigten die Beteiligung von translationalen und transkriptionellen Mechanismen in der Insulin vermittelten pro-MMP-9 Induktion in humanen THP-1 Monozyten.

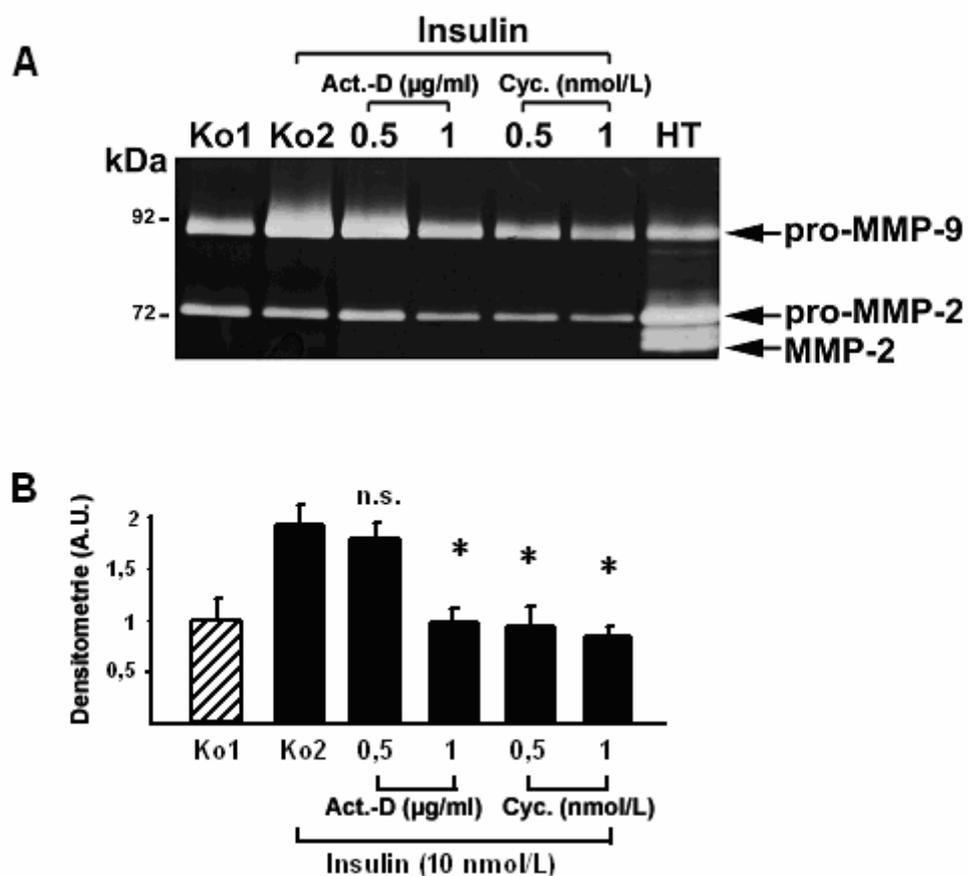


Abbildung 22. A: Exemplarische Gelatin-Zymographie der gewonnenen zellfreien Überstände nach Stimulation mit 10 nmol/L Insulin über 24 h und vorheriger Inkubation (30 Minuten) mit Cycloheximide (Cyc.) (0,5/ 1 nmol/L) oder Actinomycin D (Act.-D.) (0,5/ 1 µg/mL). Die Zellen der Kontrolle (Ko1) blieben unstimuliert. Die Positivkontrolle (Ko2) wurde mit 10 nmol/L Insulin stimuliert. HT1080 (HT)=Standart.

22. B: Graphische Darstellung des densitometrisch gemessenen und gemittelten pro-MMP-9 (n=4). Alle densitometrierten Werte wurden auf die Ko1 normalisiert, die selber auf den Wert 1 festgelegt wurde. Actinomycin D (1µg/mL) sowie Cycloheximide (0,5/ 1 µg/mL) haben signifikante inhibierende Effekte auf das Insulin vermittelte pro-MMP-9 Signal. (* p<0,05 vs. Kontrolle2).

5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Insulin die Sekretion von pro-MMP-9 in humanen THP-1 Monozyten konzentrations- und zeitabhängig stimuliert. Diese Stimulation wird durch die spezifische Aktivierung des Insulinrezeptors und hiernach folgend über die sich anschließende „mitogene Signaltransduktionskaskade“, d.h. über den MAP-Kinase Signaltransduktionsweg, vermittelt. Die so genannte „metabolische“ PI3-Kinase Signaltransduktionskaskade, welche v.a. für die Insulin vermittelte Glukoseutilisation verantwortlich ist, hat hierbei keine Bedeutung.

In den durchgeführten Experimenten dieser Arbeit wurden humane THP-1 Monozyten verwendet, da Monozyten in jedem Entwicklungsstadium der Atherosklerose präsent sind und Ursprung der makrozytären Schaumzellen sind, welche sich im subendothelialen Raum ansiedeln (Ross 1999). Sie haben somit große Bedeutung bei der Entwicklung der atherosklerotischen Läsion, in der sich histologisch in jedem Entwicklungsstadium der Atherosklerose ein Zustand von gesteigerter Inflammation nachweisen lässt. So zeigten Publikationen anderer, dass monozytäre Entzündungszellen vermehrt durch sezernierte inflammatorische Chemokine, wie z.B. MCP-1 und Osteopontin, in vaskuläre atherosklerotische Läsionen rekrutiert werden (Gosling, Slaymaker et al. 1999; Bruemmer, Collins et al. 2003; Weber, Schober et al. 2004).

Als Modell wählten wir für unsere Experimente die humane Zelllinie der THP-1 Monozyten. Arbeiten anderer zeigten, dass diese Zelllinie vergleichbar mit primär humanen Monozyten ist. So wurde gezeigt, dass THP-1 Monozyten das von uns untersuchte MMP-9 vergleichbar sezernieren (Katsuda, Okada et al. 1994; Leber and Balkwill 1998; Wong, Lumma et al. 2001; Ozaki, Miyashita et al. 2005; Stawowy, Meyborg et al. 2005; Menshikov, Torosyan et al. 2006). Besonders zeigte eine Analyse mit einem MMP Antikörperarray, dass die zellfreien Überstände von THP-1 Monozyten, die zuvor mit TNF- α bzw. Insulin stimuliert wurden, signifikant erhöhte

MMP-9 Expressionen aufwiesen, hingegen MMP-1, -2, -3, -8, -10 und -13 unbeeinflusst blieben (Kappert, Meyborg et al. 2008).

Bezüglich des Expressionsmusters der THP-1 Monozyten zeigten Kohro et al. anhand eines Oligonukleotid Mikroarray Assays, dass Genexpressionen zwischen humanen THP-1 Monozyten und primären humanen Monozyten stark differieren können, womit die Wahl des zu untersuchenden Zielproteins von großer Bedeutung war (Kohro, Tanaka et al. 2004). In unseren Experimenten wurde daher ausschließlich MMP-9 betrachtet. So zeigten Kohro et al. keine signifikante Differenz zwischen primären Monozyten und THP-1 Monozyten bezüglich der MMP-9 Expression (Kohro, Tanaka et al. 2004). Nachfolgende Arbeiten unserer Arbeitsgruppe fanden ebenso, dass MMP-9 in primären humanen Monozyten durch Insulin induzierbar ist und dieses über den mitogenen MAP-Kinase Signaltransduktionsweg vermittelt wird (Fischoeder, Meyborg et al. 2006).

Im Detail untersuchten wir die Signaltransduktionskaskaden nach Aktivierung des Insulinrezeptors in THP-1 Monozyten und zeigten zunächst mittels FACS-Analyse, dass THP-1 Monozyten den Insulinrezeptor exprimieren. Weiterhin untersuchten wir die unterschiedliche Beteiligung des „metabolischen“ sowie des „mitogenen“ Signaltransduktionswegs des Insulinrezeptors an der pro-MMP-9 Induktion durch Insulin. Hierzu sollten die Signaltransduktionsfaktoren der „metabolischen“ und „mitogenen“ Signaltransduktionskaskade des Insulinrezeptors in THP-1 Monozyten mittels selektiver pharmakologischer Inhibitoren spezifisch gehemmt werden. In Bezug auf die Signaltransduktion nach Aktivierung des Insulinrezeptors in Monozyten zeigte die Arbeit von Zoppini et al., dass humane Monozyten im Vergleich zu normalem metabolischem Gewebe, wie Adipozyten und Myozyten, in der insulinen Signaltransduktionskaskade eine Sonderstellung einnehmen, da sie einen Defekt am IRS-1 Protein aufweisen (Zoppini, Galante et al. 1994). Auch Welham et al. zeigten, dass in primären Entzündungszellen der Maus Unterschiede in der Expression von IRS-1 und IRS-2 bestehen. Hierbei war das IRS-1 Protein in T- und B-Lymphozyten sowie in Makrophagen nicht exprimiert. Dennoch konnte nach Stimulation mit IL-4 oder Insulin das IRS-2 Protein als phosphoryliert und damit als aktiviert dargestellt werden (Welham, Bone et al. 1997). IRS-Proteine sind essentiell für die Signaltransduktion des Insulinrezeptors und vermitteln das Insulinsignal mit nachfolgender Aktivierung des „metabolischen“ und

„mitogenen“ Signaltransduktionswegs (Bevan 2001). In der vorliegenden Arbeit wurden metabolische und mitogene Proteine der Signaltransduktionskaskade am Insulinrezeptor betrachtet, welche jedoch kein Defizit in ihrer Phosphorylierungskaskade nach Insulinstimulation im Western Blot zeigten. Sowohl die Aktivierung der ERK-1/ -2 als auch der PI3-Kinase durch Insulin konnte trotz der von anderen gezeigten Defizienz des IRS-1 Signalproteins dargestellt werden und reflektierte damit keinen Unterschied in diesem Abschnitt der Signalkaskade im Vergleich zum metabolischen Gewebe, wie z.B. der Skelettmuskulatur. Erklärend konnten Uddin et al. zeigen, dass THP-1 Monozyten, trotz des fehlenden IRS-1 Proteins, das IRS-2 Protein aufweisen, welches in der Signalkaskade Akt zu phosphorylieren vermochte (Uddin, Fish et al. 1997). Somit ist wahrscheinlich, dass das IRS-2 Protein ersetzende Eigenschaften des fehlenden IRS-1 Proteins übernimmt.

THP-1 Monozyten stellen nur ein in vitro Modell dar und müssen im Vergleich zur Insulinrezeptorexpression von Monozyten im Zustand einer Insulinresistenz in vivo kritisch betrachtet werden. An Hand isolierter humaner Monozyten konnte gezeigt werden, dass im Zustand einer bestehenden Insulinresistenz diese eine verminderte Anzahl von Insulinrezeptoren aufweisen (Nigro, Osman et al. 2006). Nachfolgende Arbeiten unserer Untersuchungen sollten daher auch isolierte Monozyten insulinresistenter Patienten mit Kontrollzellen insulin sensitiver Patienten in Hinblick auf Insulin induziertem MMP-9 vergleichen. Der Vorteil der hier verwendeten THP-1 Monozyten liegt in der Reinheit der Kultur, da es bei der Isolation primärer humaner Monozyten zu Verunreinigungen kommen kann, welche das Experiment beeinflussen. Vor allem Granulozyten sind eine Quelle, da sie die Fähigkeit besitzen pro-MMP-9 in Vesikeln zu speichern (Van den Steen, Dubois et al. 2002).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass THP-1 Monozyten für die Untersuchung von pro-MMP-9 ein geeignetes Modell für mononukleäre Zellen sind, wobei die mögliche Umdifferenzierung zu Makrophagen beachtet werden musste. Diese Aktivierung zu Makrophagen konnte in den Experimenten dieser Arbeit ausgeschlossen werden, da nur Passagen von THP-1 Monozyten unter 17 verwendet wurden. Die Umdifferenzierung konnte schon unter dem Lichtmikroskop beobachtet werden, indem sich die runden, hell leuchtenden in Suspension befindlichen THP-1 Monozyten zu dunkleren adhärennten Zellen mit

pseudopodienartigen Mikrovilli differenzierten. Diese Umdifferenzierung trat in der Regel nach den Passagen 17-20 auf.

Um die Induktion von pro-MMP-9 in THP-1 Monozyten durch Insulin darzustellen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Methode der Gelatin-Zymographie und des Western Blots verwendet. Diese sind neben anderen möglichen Methoden, wie dem ELISA oder der Immunhistochemie, zuverlässige und sensitive Methoden zum Nachweis von Gelatinasen auf der Grundlage differenter Molekulargewichte (Kleiner and Stetler-Stevenson 1994). In der Gelatin-Zymographie stellten sich zwei Banden dar, eine bei 92 kDa, die andere bei 72 kDa, die von der molekularen Größe her pro-MMP-9 bzw. pro-MMP-2 zugeordnet werden konnten. Die verwendete Standardprobe der Zelllinie HT1080 bestätigte diese Banden. Die Intensität der 92 kDa Bande (pro-MMP-9) war Insulin vermittelt zeit- und konzentrationsabhängig, was der Western Blot mittels spezifischem pro-MMP-9 Antikörper bestätigte. Die aktive Form von MMP-9 zeigte sich nicht in der Gelatin-Zymographie, da wir die Experimente mit 0 % fetalem Kälberserum durchführten, welches keine pro-MMP-9 aktivierenden Serinproteasen beinhaltet.

In vivo wird MMP-9 zunächst als Proform sezerniert, welche dann durch weitere Proteasen extrazellulär vollständig aktiviert werden muss (Van den Steen, Dubois et al. 2002). Gough et al. zeigten in einem apoE^{-/-} Mausmodell, dass diese Proform trotz der 10-fachen Überexpression nicht fähig war Fissuren der Plaquekappe auszulösen. Erst die Überexpression von autokatalytisch-aktiviertem MMP-9 zeigte eine Signifikanz von vermehrt induzierten Plaquerupturen (Gough, Gomez et al. 2006). Dieser Versuch zeigte die Notwendigkeit der Aktivierung von pro-MMP-9, um zu einer Instabilität der atherosklerotischen Plaques beizutragen. Andererseits konnten Katsuda et al. in humanen Aortenexplantaten zeigen, dass durch mitinkubierte THP-1 Monozyten und nachweislich sezerniertem pro-MMP-9 nach 5 Tagen die vorher vorhandenen elastischen Fasern degradiert waren (Katsuda, Okada et al. 1994). Es existiert demnach in der humanen Gefäßmatrix eine Möglichkeit das von THP-1 Monozyten produzierte pro-MMP-9 zu aktivieren und damit die Balance des extrazellulären Turnovers aus dem Gleichgewicht zu bringen. Des Weiteren konnten Bannikov et al. zeigen, dass selbst nur die Bindung von pro-

MMP-9 an Gelatine oder Kollagen Typ IV eine Aktivität dem Enzym verleiht, ohne jedoch einer Abspaltung des Propeptids (Bannikov, Karelina et al. 2002).

In unseren Experimenten zeigten wir, dass das von Insulin induzierte pro-MMP-9 in THP-1 Monozyten durch 4-Aminophenylmercuriumacetat (APMA) vollständig in seine aktive Form überführt werden konnte. APMA, als organische chemische Substanz, ist neben den physiologisch in vivo vorhandenen Proteasen im Stande pro-MMP-9 zu aktivieren. Der Inkubation mit APMA folgt eine schrittweise ablaufende Fragmentation des Propeptids von pro-MMP-9 und führt somit zur Freilegung des katalytischen Zentrums und zur vollständigen Aktivierung der Gelatinase (Van den Steen, Dubois et al. 2002). Somit ist das von THP-1 Monozyten nach Insulinstimulation sezernierte MMP-9 prinzipiell in der Lage enzymatisch aktiv zu sein.

Das in der Gelatin-Zymographie gemessene pro-MMP-2 war in unserer Arbeit weder durch Insulin noch durch TNF- α induzierbar, was andere Arbeiten unterstützten. Hier konnte gezeigt werden, dass MMP-2 vor allem in mesenchymalen Zellen, wie z.B. in Fibroblasten, glatten Muskelzellen oder CD34+ Stammzellen durch Zytokine hochreguliert wird, jedoch in den meisten Zellen nach Zytokinstimulation unbeeinflusst bleibt (Van den Steen, Dubois et al. 2002).

Verschiedene Arbeiten zeigen, dass generell Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone und die Interaktion mit extrazellulären Matrixkomponenten die Produktion der MMPs regulieren können, welche die Transkription der Proteasen erhöhen können (Nagase, Visse et al. 2006). Hier wurde festgestellt, dass MMP-9 durch proinflammatorische Mediatoren, wie oxidierte Lipoproteine, TNF- α und LPS sowie durch Chlamydia pneumoniae verstärkt induziert werden kann (Kol, Sukhova et al. 1998; Leber and Balkwill 1998; Shah 1998; Xu, Meisel et al. 1999; Lai, Zhou et al. 2003). In dieser Arbeit wählten wir TNF- α zum Vergleich des Insulin induzierten MMP-9 Effekts, welches als eines der potentesten Zytokine zur Stimulation von MMP-9 in THP-1 Monozyten gilt (Robinson, Scott et al. 2002). Insulin zeigte in unserer Arbeit den Effekt MMP-9 zu stimulieren, wie TNF- α ; dies schon ab einer Konzentration von 0,1 nmol/L, was der Konzentration im Nüchternserum von insulinresistenten Patienten entspricht (Weyer, Hanson et al. 2000).

Des Weiteren sollte in dieser Arbeit geklärt werden, durch welche Signal übertragenen Mechanismen Insulin pro-MMP-9 induziert. Menshikov et al. zeigten in der pro-MMP-9 Induktion in THP-1 Monozyten sowohl die Beteiligung von erhöhter Speicherung und Freisetzung aus Sekretgranula als auch die vermehrte Proteinbiosynthese (Menshikov, Elizarova et al. 2002). Hierzu stimulierten sie THP-1 Monozyten mit Urokinase. Neben der pro-MMP-9 Induktion durch Urokinase beschrieben Menshikov et al. durch Monensin, einem Inhibitor des Transfers durch das *trans*-Golgi Netzwerk (TGN), eine partielle Suppression von pro-MMP-9. Zudem konnte eine Inhibition durch die pharmakologischen Inhibitoren Cycloheximid und Actinomycin D dargestellt werden (Menshikov, Elizarova et al. 2002). Somit sind Transkription und Translation bei der MMP-9 Regulation durch Insulin in THP-1 Zellen beteiligt.

Wir konnten mit den gleichen Inhibitoren Cycloheximid und Actinomycin D einen vergleichbaren inhibitorischen Effekt nachweisen. Die mit Insulin stimulierten und mit den Inhibitoren Cycloheximid oder Actinomycin D 30 Minuten vorinkubierten THP-1 Monozyten zeigten, dass das Insulin induzierte pro-MMP-9 von Translation und Transkription abhängig ist.

Wie in dieser Arbeit weiter gezeigt werden konnte, wird der Insulinrezeptor auf THP-1 Monozyten exprimiert. THP-1 Monozyten exprimieren jedoch auch den IGF-1 Rezeptor, welcher eine 60 % Homologie zum Insulinrezeptor aufweist (Ullrich, Gray et al. 1986; LeRoith, Werner et al. 1995). Insulin bindet ca. 100-fach stärker an den Insulinrezeptor, als an den IGF-1 Rezeptor, vermag jedoch in hohen Konzentrationen auch an diesen zu binden (Li, Barrett et al. 2005). Konzentrationen von 10 nmol/L Insulin und mehr wurden in der Arbeit von Li et al. mit bovinen aortären endothelialen Zellen nicht mehr als selektiv für den Insulinrezeptor angesehen, denn neben der Insulinrezeptoraktivierung konnte auch eine Phosphorylierung des IGF-1 Rezeptors nachgewiesen werden (Li, Barrett et al. 2005).

Um nun den Insulinrezeptor und IGF-1 Rezeptor zu differenzieren, wählten wir einen ersten Versuchsansatz durch die Inhibition von Furin. Furin gehört zu der Gruppe der Subtilisin/ Kexin-ähnlichen Familie der Proprotein Convertasen und wird auf THP-1

Monozyten exprimiert, was mittels FACS-Analyse in dieser Arbeit, wie auch in anderen gezeigt werden konnte (Stawowy, Kallisch et al. 2005). Furin ist ein Schlüsselregulator von Zellfunktionen, die zu Atherosklerose und Restenosen führt (Stawowy and Fleck 2005). Furin kommt im TGN, in sekretorischen Granula und an der Zelloberfläche vor und ist an der Aktivierung von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Adhäsionsmolekülen und MMPs beteiligt (Seidah and Chretien 1999). Diese werden initial als größere, inaktive Vorstufen synthetisiert. Während ihrer Aktivierung unterliegen sie verschiedenen posttranslationalen Modifikationen; unter anderem der limitierten Endoproteolyse des Propeptids, die zu einer biologisch aktiven Form führt (Seidah and Chretien 1999; Thomas 2002; Stawowy and Fleck 2005). Für Furin wurde eine spezielle Funktion an der posttranslationalen Modifikation des Insulinrezeptors im TGN beschrieben, wobei gezeigt werden konnte, dass durch Furin fehlerhaft gebildete membranöse Proteine, wie z.B. falsch gefaltete Insulinrezeptoren, degradiert und deren Elimination eingeleitet wurde (Bass, Turck et al. 2000).

Zur spezifischen Inhibition von Furin nutzten wir den pharmakologischen Inhibitor decanoyl-RVKR-chloromethylketone (dec-CMK) (Hallenberger, Bosch et al. 1992) und untersuchten die Insulinrezeptoraktivierung. Dabei zeigten sich nach Inhibition von Furin mit dec-CMK im Western Blot die unaktivierten Propeptidformen des Insulinrezeptors, womit Furin essentiell für dessen Aktivierung in THP-1 Monozyten ist. Weiterhin zeigte sich in der Gelatin-Zymographie, dass auch die Insulin vermittelte Induktion von pro-MMP-9 durch dec-CMK signifikant inhibiert wurde. Dies sprach dafür, dass das Signal der MMP-9 Induktion durch den Insulinrezeptor vermittelt wurde. Hingegen wurde das im Vergleich durch TNF- α induzierte pro-MMP-9 nicht von dec-CMK inhibiert, da für den TNF- α Rezeptor keine Aktivierung durch Furin notwendig ist. Dies zeigt auch, dass die Signaltransduktionswege prinzipiell intakt sind und der Effekt von dec-CMK auf die Insulin vermittelte MMP-9 Induktion nicht toxisch ist, da auch durch TNF- α stimulierten Zellen mit dec-CMK behandelt waren.

Stawowy et al. zeigten jedoch, dass Furin ebenfalls den IGF-1 Rezeptor in VSMCs und Monozyten aktivieren kann und damit eine Bedeutung des IGF-1 Rezeptors in der Insulin induzierten pro-MMP-9 Synthese noch nicht ausgeschlossen werden konnte (Stawowy, Kallisch et al. 2004). Aus diesem Grund führten wir weitere

Versuche unter Verwendung eines spezifisch blockierenden Antikörpers gegen den IGF-1 Rezeptor durch. Im Western Blot zeigte sich, dass die durch IGF-1 vermittelte Aktivierung von p-Akt durch den blockierenden IGF-Rezeptor Antikörper ausblieb, jedoch die mit Insulin stimulierte pro-MMP-9 Induktion bestehen blieb. Trotz des blockierenden IGF-1 Rezeptor Antikörpers konnte durch Insulin ein weiterhin signifikant bestehendes pro-MMP-9 Signal in humanen THP-1 Monozyten gezeigt werden. Insulin stimulierte damit auch bei einer Konzentration von 10 nmol/L selektiv Insulinrezeptor abhängig und unabhängig vom IGF-1 Rezeptor in THP-1 Monozyten pro-MMP-9.

Die hier dargestellten Ergebnisse sind von klinischer Relevanz. Studien zeigten, dass die Insulinresistenz und der Diabetes mellitus Typ 2 mit einer erhöhten kardiovaskulären Morbidität und Mortalität assoziiert sind (Kannel and McGee 1979). Insulinresistenz ist das Hauptmerkmal des Diabetes mellitus Typ 2, wobei die kompensatorisch einsetzende Hyperinsulinämie bereits einen Zustand darstellt, welcher mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko einhergeht (Jarrett, McCartney et al. 1982; Haffner, Mykkanen et al. 2000; Pyorala, Miettinen et al. 2000; Hu, Stampfer et al. 2002). In solch einem Zustand der Hyperinsulinämie mit noch unauffälligen Blutglukosespiegeln sind die Patienten klinisch meist noch nicht als Diabetiker identifiziert, da sie frei von Symptomen sind. Durch einen oralen Glukosetoleranztest oder die Berechnung des HOMA-Index könnten solche Patienten identifiziert werden.

Studien legen nahe, dass es sich bereits bei der Insulinresistenz um einen proinflammatorischen Zustand handelt. Neuere Untersuchungen zeigen, dass gerade das viszerale intraabdominelle Fettgewebe zur Insulinresistenz und Inflammation beiträgt (Ahima 2006). Adipozyten sind in der Lage eine Reihe von inflammatorischen Cytokinen, wie TNF- α , Leptin, Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 und IL-6 zu synthetisieren, die zur Entwicklung der Insulinresistenz beitragen (Lyon, Law et al. 2003).

Weitere Studien an insulinresistenten adipösen Patienten bzw. Patienten mit metabolischem Syndrom zeigten, dass eine Korrelation zwischen erhöhten MMP-9 Serumspiegeln und Insulinresistenz besteht. Die Arbeitsgruppe von Ghanim et al. untersuchte in einer Studie adipöse Frauen mit Insulinresistenz und einer vierfach

erhöhten Konzentration an Insulin bei gleichem Glukosespiegel im Plasma im Vergleich zu gesunden normalgewichtigen Frauen (Ghanim, Aljada et al. 2004). Es ergab sich bei den insulinresistenten Patientinnen eine signifikante Erhöhung von MMP-9 um 78 % im Plasma sowie von proinflammatorischen Genen (z.B. NF-kappaB) in isolierten Monozyten (Ghanim, Aljada et al. 2004). Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, in welchem proinflammatorischen Zustand sich insulinresistente adipöse Patientinnen befinden.

Im Gegensatz dazu untersuchten Baugh et al. die MMP-9 Expression von isolierten Monozyten von normalgewichtigen Patienten (BMI<28, Durchschnittsalter 56 Jahre) mit manifestem Diabetes mellitus Typ 2 im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Baugh, Gavrilocic et al. 2003). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden o.g. Gruppen. Hier ist jedoch das Vorhandensein des metabolischen Syndroms auf Grund des normalen BMI fraglich. Zudem wurden in dieser Studie Patienten ausgeschlossen, die an einer koronaren Herzerkrankung litten. Interessant bleibt hier dennoch zu erwähnen, dass alleine eine Hyperglykämie von durchschnittlich 8,6 mmol/L im Vergleich zu 4,7 mmol/L keinen Effekt auf MMP-9 in Monozyten hatte (Baugh, Gavrilocic et al. 2003).

Im Gegensatz dazu publizierten Derosa et al. MMP-9 Daten von Typ 2 Diabetikern, die jedes Kriterium des metabolischen Syndroms, wie Insulinresistenz, Adipositas, Bluthochdruck und Fettstoffwechselstörungen erfüllten. Diese Patienten hatten im Vergleich zu gesunden Kontrollen unter anderem hoch signifikant gesteigerte MMP-9 Spiegel im Plasma (Derosa, D'Angelo et al. 2007). In einer weiteren Studie von Derosa et al., in der Patienten mit akutem Koronarsyndrom und ohne diabetische Stoffwechsellage mit Patienten mit Typ 2 Diabetes, metabolischem Syndrom und akutem Koronarsyndrom verglichen wurden, zeigte sich das gleiche Bild zu Ghanim et al. (Ghanim, Aljada et al. 2004), wobei MMP-9 im Plasma als erhöht bei solchen Patienten nachzuweisen war, die das metabolische Syndrom aufwiesen. (Derosa, Cicero et al. 2007).

Von Bedeutung ist auch die Studie von Glowinska-Olszewska et al., weil sie insulinresistente Jugendliche (Durchschnittsalter 15 Jahre) mit Adipositas und Bluthochdruck auf ihre MMP-9 Spiegel hin untersuchte und diese mit gleichaltrigen normalgewichtigen Kindern verglich. Es zeigten sich signifikant erhöhte MMP-9

Werte im Plasma der adipösen insulinresistenten Jugendlichen (Glowinska-Olszewska and Urban 2007).

Das erhöhte kardiovaskuläre Risiko wird pathophysiologisch durch das erhöhte Risiko der Ruptur einer atherosklerotischen Plaque bestimmt, was zum akuten Koronarsyndrom führt (Virmani, Kolodgie et al. 2000). Humane atherosklerotische Läsionen und vaskuläres Remodeling sind durch eine Dysregulation des extrazellulären Matrixumbaus gekennzeichnet (Jones, Kay et al. 2006). MMP-9 ist eines der mehr als 20 Mitglieder der matrixdegradierenden Metalloproteinasefamilie und kann Elastin, Typ IV Kollagen und degradiertes Kollagen abbauen, wodurch MMP-9 eine entscheidende Rolle in der vaskulären atherosklerotischen Läsion zu spielen scheint (Burleigh, Briggs et al. 1992).

Klinische Studien zeigten somit auch eine Korrelation zwischen erhöhtem MMP-9 und dem Auftreten von Plaquerupturen. So zeigte sich, dass MMP-9 lokal in koronar atherosklerotischen Läsionen von Patienten mit akutem Koronarsyndrom im Vergleich zu Normalkontrollen signifikant erhöht war (Brown, Hibbs et al. 1995). Noch genauer konnte in definierten vulnerablen Regionen von atherosklerotischen Plaques, wie der Plaqueschulter und Regionen in denen Schaumzellen akkumulieren, eine signifikant gesteigerte Expression an MMP-9 festgestellt werden (Galis, Sukhova et al. 1994; Galis, Sukhova et al. 1995). In einer retrospektiven Arbeit von Jones et al. konnte ein erhöhter MMP-9 Spiegel als unabhängiger Risikofaktor für eine erhöhte Restenoserate von koronaren bare-metal Stents identifiziert werden. Diese MMP-9 Spiegel wurden in heparinisierten Plasmaproben durch ein Biotrak Activity Assay System analysiert (Jones, Kay et al. 2006). Eine weitere Studie zeigte, dass der Serumspiegel von MMP-9 bei Patienten mit einem Myokardinfarkt oder instabiler Angina pectoris im Vergleich zu einer Gruppe mit stabiler Angina pectoris signifikant erhöht war (Fukuda, Shimada et al. 2006).

Somit besteht ein Zusammenhang zwischen Insulinresistenz, Hyperinsulinämie, MMP-9 und kardiovaskulären Ereignissen. Die Bedeutung von Insulin für die Induktion von MMP-9 wird auch durch in vivo Tiermodelle unterstützt. In einem Modell der Hyperinsulinämie setzten Boden et al. Ratten für vier Stunden einer

euglykämischen Hyperinsulinämie aus und isolierten anschließend Aortengewebe. Es zeigte sich ein signifikant 13-facher Anstieg von MMP-9 im Vergleich zur Kontrollgruppe, der eine NaCl-Lösung anstatt Insulin infundiert wurde. Diese MMP-9 Induktion durch eine euglykämischen Hyperinsulinämie konnte sogar durch eine zusätzlich zeitgleiche Infusion von freien Fettsäuren auf das 23 fache im Vergleich zur o.g. Kontrollgruppe gesteigert werden. Angemerkt werden muss, dass die alleinige Infusion von freien Fettsäuren keine induzierenden Effekte auf MMP-9 auslöste, so dass deutlich wird, dass Insulin hier eine zentrale Rolle zu spielen scheint (Boden, Song et al. 2007).

Da in den oben genannten Publikationen MMP-9 als bedeutender destabilisierender Faktor für Plaqueläsionen identifiziert wurde und in weiteren Publikationen eine Korrelation zwischen einer bestehenden Hyperinsulinämie und MMP-9 bestand, stellte sich die Frage, ob Insulin im Zustand der Hyperinsulinämie auch selbst eine entscheidende Rolle in der Entwicklung atherosklerotischer Plaqueläsionen über eine Induktion von MMP-9 spielen könnte (Blankenberg, Rupprecht et al. 2003; Fukuda, Shimada et al. 2006; Gough, Gomez et al. 2006).

In dieser Frage, ob Insulin selbst proatherogen oder antiatherogen zu sein scheint gibt es unterschiedliche Anhaltspunkte. Insulin selbst hat positive und negative Effekte auf die atherosklerotische Pathogenese gezeigt. So wurde dargestellt, dass Insulin in endothelialen Gefäßzellen durch Aktivierung der endothelialen NO-Synthase NO induziert (Zeng, Nystrom et al. 2000), welches die Vasodilation fördert. Zudem zeigte sich durch die Aktivierung der endothelialen NO-Synthase eine Reduktion von Inflammation und Plättchenaggregation sowie der Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen (Hsueh and Quinones 2003). Im Gegensatz dazu konnten andere Arbeiten Insulineffekte in vaskulärem Gewebe beobachten, die zur Entwicklung der Atherosklerose führen. In vitro konnte eine Inhibition der Apoptose von THP-1 Zellen durch Insulin nachgewiesen werden, welches einen Einfluss auf die Plaquestabilität haben könnte (Kockx and Herman 1998; Iida, Suzuki et al. 2002). Weiterhin wurde gezeigt, dass Insulin indirekt die Expression von Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1), ein Marker für Inflammation, erhöht. Diese erhöhten PAI-1 Werte konnten im Plasma von insulinresistenten Patienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe gefunden werden (Schneider, Absher et al. 1997). Ebenso gilt Insulin als stimulierend auf die Migration von glatten Muskelzellen (VSMCs), die

einen wichtigen Beitrag zum vermehrten Wachstum der Plaqueläsion leisten (Wang, Gurevich et al. 2003).

Prinzipiell vermittelt Insulin über zwei mögliche Signaltransduktionswege seine Effekte. Zum einen handelt es sich um die „metabolische“ Signaltransduktionskaskade vermittelt durch die PI3-Kinase, die Effekte wie die Glukoseaufnahme in die Zelle und die Fett- und Glykogensynthese vermittelt. Zum anderen ist die „mitogene“ Signaltransduktion, die durch die MAP-Kinase vermittelt wird, entscheidend für proliferative Effekte. Schon dies ließ vermuten, dass der letztere Weg der entscheidende ist um MMP-9 zu induzieren, da MMP-9 proliferierende und migrierende Eigenschaften auf humane epidermale Keratinozyten, Monozyten und glatte Gefäßmuskelzellen zeigte (Zeigler, Chi et al. 1999; Wagsater, Zhu et al. 2009).

Im Zustand der Insulinresistenz sind mehrere Insulin vermittelte Effekte, wie z.B. die Translokation von GLUT-4 Transportern auf die Zellmembran in metabolischem Gewebe vermindert. Weiter zeigten Publikationen, dass in vaskulärem Gewebe von insulinresistenten Patienten entscheidende Insulinsignaltransduktionswege unterschiedlich betroffen sind. So zeigte sich im Zustand der Insulinresistenz die PI3-Kinase Signalkaskade als isoliert betroffen, was in endothelialen Gefäßzellen zu einer verringerten NO-Synthese führte, welche oben genannte positive Insulineffekte verminderte (Hsueh and Law 1999). Im Gegensatz dazu zeigte sich in glatten Gefäßmuskelzellen, dass die negativen Insulineinflüsse, die dem mitogenen Insulinsignaltransduktionsweg zugeschrieben wurden, weiterhin uneingeschränkt vorhanden sind (Cusi, Maezono et al. 2000). Diese Dysbalance der Insulin abhängigen „metabolischen“ und „mitogenen“ Signaltransduktionskaskaden könnte zu einem pro-atherogenen Effekt von Insulin beitragen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Induktion von MMP-9 durch Insulin vom „mitogenen“ Signaltransduktionsweg, d.h. von der Aktivierung der MAP-Kinase abhängig ist. Spezifische pharmakologische Inhibitoren des mitogenen Signaltransduktionswegs, wie PD98059 und U0126 verringerten die MMP-9 Induktion durch Insulin signifikant. Auch McCawley et al. beschrieben, dass die MMP-9 Synthese durch den epidermalen Wachstumsfaktor in Keratinozyten ebenfalls über eine ERK1/2 Aktivierung vermittelt wurde, was unsere Ergebnisse unterstützt (McCawley, Li et al. 1999)

Die Hypothese, dass die Insulinresistenz allein die „metabolischen“ Signaltransduktionskaskade betrifft, wird von mehreren Publikationen gestützt. In humanen Muskelbiopsien von adipösen, nicht diabetischen Patienten und Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 im Vergleich zu Normalkontrollen zeigten sich signifikante Unterschiede in der insulinigen Signaltransduktionskaskade: nach der Stimulation mit Insulin bei unveränderter MAP-Kinase Aktivierung war eine deutliche Verringerung im „metabolischen“ PI3-Kinase Signaltransduktionsweg in der Gruppe der adipösen nicht diabetischen Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe zu erkennen. Nahezu nicht vorhanden zeigte sich sogar die „metabolische“ Phosphorylierungskaskade in der Gruppe der Typ 2 Diabetiker (Cusi, Maezono et al. 2000). Auch Tierversuche unterstützen diese Befunde. In vaskulärem Gewebe von adipösen diabetischen Ratten im Vergleich zu den Kontrollen zeigte sich eine Verringerung in der PI3-Kinaseaktivität und der Serinphosphorylierung von Akt, jedoch nicht in der Tyrosinphosphorylierung von ERK-1/-2 (Jiang, Lin et al. 1999). Pandolfi et al. zeigten in humanen Fibroblasten von insulinresistenten Patienten vergleichbare Ergebnisse (Pandolfi, Solini et al. 2005). Nach Insulinstimulation war die Akt-Phosphorylierung und damit auch die NO-Produktion in den Fibroblasten vermindert im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe ohne nachzuweisende Insulinresistenz. Hingegen stellte die Induktion der MAP-Kinase Aktivierung und so auch die Produktion von PAI-1 keinen Unterschied zur Kontrollgruppe dar (Pandolfi, Solini et al. 2005). Das legte die Hypothese nahe, dass in Zellen von insulinresistenten Patienten die antiatherogenen Insulineffekte, wie die Produktion von NO, vermindert sind, jedoch die proatherogenen Effekte von Insulin bestehen bleiben.

Weiter konnten Jonas et al. in „Zucker Fatty Rats“, einem Rattenmodell für das metabolische Syndrom, charakterisiert durch schwere Adipositas, Insulinresistenz, Hyperinsulinämie und Fettstoffwechselstörung, nach Ballondilatation der Arterie und Stentimplantation zeigen, dass nach 7 und 14 Tagen signifikant in der Gefäßregion der Verletzung p-ERK erhöht und um vermindert im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Insulinresistenz mit Stentverletzung war. Diese Veränderung auf Proteinebene während der Gefäßreparatur spiegelt den Zustand der Insulinresistenz am Insulinrezeptor wider, der durch eine Veränderung im Insulinsignaling zu Gunsten der Mitogenität charakterisiert ist (Jonas, Edelman et al. 2005).

Solch Übergang zu einem vermehrten mitogenen Signaling mit verminderter metabolischer Antwort, das charakteristisch für die Insulinresistenz ist, konnten durch Montagnani et al. *in vitro* imitiert werden, indem die PI3-Kinase durch pharmakologische Inhibitoren blockiert wurde (Montagnani, Golovchenko et al. 2002). Anders als in vorigen Modellen erfolgte keine gleich bleibende Expression der MAP-Kinase, sondern durch die Hemmung der PI3-Kinase zeigte sich eine verstärkte Expression von VCAM-1 und E-Selektin, die nachweislich MAP-Kinase abhängig reguliert wurden. Dadurch kam es zu einer verstärkten Interaktion zwischen Endothelzellen und Monozyten (Montagnani, Golovchenko et al. 2002). Gleichfalls steigerten VSMCs *in vitro* ihre durch das mitogene Signaling vermittelte Migration nach der Inhibition der PI3-Kinase mit Wortmannin (Wang, Gurevich et al. 2003). Die beiden letzt genannten Publikationen zeigten, dass durch die Inhibition der metabolischen Signaltransduktion der mitogene Signaltransduktionsweg verstärkt aktiviert werden kann.

Einen weiteren Hinweis für eine defekte Signaltransduktionskaskade und Verschiebung zum mitogenen Signaltransduktionsweg lieferten Beobachtungen an isolierten Monozyten von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2. Die Monozyten von Typ 2 Diabetikern exprimierten deutlich vermehrt Scavenger-Rezeptoren (CD36), welche abhängig von der MAP-Kinase reguliert werden (Sampson, Davies et al. 2003). Interessanterweise konnte an Makrophagen von Mäusen beobachtet werden, dass sie, nachdem sie mit PI3-Kinase Inhibitoren inkubiert wurden, eine vermehrte Expression des CD36-Rezeptors aufwiesen (Liang, Han et al. 2004).

Mittels spezifischer pharmakologischer Inhibitoren unterschiedlicher Komponenten des „metabolischen“ Insulinsignaltransduktionswegs (Akt, GSK, eNOs und p70s6) untersuchten wir deren Beteiligung an der Insulin abhängigen MMP-9 Induktion. Durch die verwendeten Inhibitoren (Wortmannin, LY294002, Rapamycin) konnten keine Hemmung von MMP-9 demonstriert werden. Folglich wurde die pro-MMP-9 Induktion durch Insulin alleinig abhängig vom „mitogenen“ Signaltransduktionsweg vermittelt.

Diese Arbeit zeigt auch, dass der durch Insulin induzierte Signaltransduktionsfaktor p38, obwohl Bestandteil der „mitogenen“ Signaltransduktion, nicht an der Insulin vermittelten MMP-9 Induktion beteiligt ist. Auch Lai et al. bestätigten, die in unserer Arbeit gezeigten Ergebnisse in der Signaltransduktion, wobei sie die Induktion von

MMP-9 in LPS stimulierten Monozyten in ihrem MAPK Signaltransduktionsweg untersuchten. Sie konnten zeigen, dass der auch in dieser Arbeit verwendete p38 Inhibitor SB203580 zwar die MMP-1 Sekretion, jedoch nicht die MMP-9 Sekretion hemmt (Lai, Zhou et al. 2003).

Von der Annahme ausgehend, dass die Insulinresistenz ein primär biochemischer Defekt ist, der sich durch eine verringerte metabolische Antwort am Insulinrezeptor mit einem Übergewicht der „mitogenen“ Signaltransduktion darstellt, sollte nach solchen Interventionen gesucht werden, die das Ungleichgewicht von „metabolischer“ und „mitogener“ Signaltransduktion zu kompensieren vermögen. Bestätigend zu den antidiabetischen Insulin sensitivierenden Effekten konnten z.B. für den PPAR- γ Agonisten Rosiglitazon signifikante kardioprotektive Effekte nachgewiesen werden, die von einer signifikanten Inhibition der Aktivierung der MAP-Kinase begleitet wurden (Molavi, Chen et al. 2006). Eine solche klinische Behandlung mit PPAR-Agonisten zeigte auch eine Verbesserung in der Glukosehomöostase. Darüber hinaus konnte die Behandlung von Typ 2 Diabetiker über mehrere Wochen mit Rosiglitazon MMP-9 Spiegel im Serum der Patienten signifikant senken (Haffner, Greenberg et al. 2002; Marx, Froehlich et al. 2003). Solche Effekte konnten in der Publikation von Kappert et al. in vitro bestätigt werden, wobei die durch Insulin verstärkt induzierte MMP-9 Expression in THP-1 Monozyten, welche durch die „mitogene“ Signaltransduktionskaskade vermittelt wurde, durch den PPAR- γ -Liganden Pioglitazon inhibiert werden konnte (Kappert, Meyborg et al. 2008). Somit zeigte sich in klinischen und experimentellen Studien, dass die antidiabetischen PPAR-Agonisten nicht nur Insulin sensitivierende Effekte hatten, sondern auch Einfluss auf die MMP-9 Serumspiegel haben könnten. Letzteres wäre ein Ansatzpunkt um das kardiovaskuläre Risiko von Diabetikern zu senken.

6. Zusammenfassung

Das metabolische Syndrom ist ein wichtiger Faktor der erhöhten kardiovaskulären Morbidität und Mortalität. Adipositas und die dadurch bedingte Insulinresistenz und die Hyperinsulinämie sind Hauptcharakteristika des metabolischen Syndroms. Die Insulinresistenz ist gekennzeichnet durch eine Dysbalance in der „mitogenen“ MAP-Kinase und „metabolischen“ PI3-Kinase Signalkaskade, wobei die Aktivierung mitogener Wege überwiegt.

Matrix Metalloproteinasen (MMPs) sind proteolytisch aktive Enzyme, die vor allem von mononukleären Entzündungszellen in kardiovaskulären vulnerablen atherosklerotischen Läsionen vermehrt exprimiert werden und damit die Plaquestabilität schwächen können. Besonders MMP-9 zeigt eine große Bedeutung bei Plaquerupturen in Tiermodellen und klinischen Studien zum akuten Koronarsyndrom.

Diese Arbeit zeigt die Regulation von MMP-9 durch Insulin in humanen THP-1 Monozyten. Die Stimulation von THP-1 Monozyten durch Insulin zeigte eine zeit- und konzentrationsabhängig gesteigerte MMP-9 Expression. Die Inhibition der Insulinrezeptoraktivierung durch die Inhibition seiner aktivierenden Proprotein Convertase Furin mit dem pharmakologischen Furininhibitor dec-CMK zeigte, dass Insulin MMP-9 durch die Aktivierung des Insulinrezeptors induziert. Zudem schloss ein blockierender IGF-1 Rezeptorantikörper die Beteiligung des IGF-1 Rezeptors an der MMP-9 Induktion aus. Die Untersuchungen der Signaltransduktionskaskade erbrachte, dass die Inhibition der Aktivierung der metabolischen PI3-Kinase durch Wortmannin oder LY294002 keinen Einfluss auf die insulinabhängige MMP-9 Induktion hatte. Hingegen demonstrierte die Inhibition der mitogenen MAP-Kinase durch PD98059 oder U0126 eine signifikante Inhibition der Insulin vermittelten MMP-9 Induktion in THP-1 Monozyten. Weiter zeigte sich die Identifizierung der Regulation von MMP-9 auf transkriptioneller und translationaler Ebene.

Schlussfolgernd kann eine Insulin vermittelte MMP-9 Induktion in THP-1 Monozyten demonstriert werden, welche von der mitogene Signaltransduktionskaskade des

Insulinrezeptors abhängig ist, wobei die metabolische Signaltransduktion des Insulinrezeptors keine Rolle spielt. Dieser ist im Zustand der Insulinresistenz gestört.. Die Induktion von MMP-9 durch Insulin könnte somit potentiell zu dem proinflammatorischen Zustand und damit zu einer erhöhten kardiovaskulären Morbidität und Mortalität bei Patienten mit Insulinresistenz und Typ 2 Diabetes mellitus beitragen.

7. Literaturverzeichnis

- ADA (1999). "American Diabetes Association: clinical practice recommendations 1999." Diabetes Care **22 Suppl 1**: S1-114.
- Ahima, R. S. (2006). "Adipose tissue as an endocrine organ." Obesity (Silver Spring) **14 Suppl 5**: 242S-249S.
- Alarcon, C., B. Cheatham, et al. (1994). "A Kex2-related endopeptidase activity present in rat liver specifically processes the insulin proreceptor." Biochem J **301 (Pt 1)**: 257-65.
- Bannikov, G. A., T. V. Karelina, et al. (2002). "Substrate binding of gelatinase B induces its enzymatic activity in the presence of intact propeptide." J Biol Chem **277(18)**: 16022-7.
- Bass, J., C. Turck, et al. (2000). "Furin-mediated processing in the early secretory pathway: sequential cleavage and degradation of misfolded insulin receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **97(22)**: 11905-9.
- Baugh, M. D., J. Gavrilovic, et al. (2003). "Monocyte matrix metalloproteinase production in Type 2 diabetes and controls--a cross sectional study." Cardiovasc Diabetol **2**: 3.
- Bevan, P. (2001). "Insulin signalling." J Cell Sci **114(Pt 8)**: 1429-30.
- Blankenberg, S., H. J. Rupprecht, et al. (2003). "Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease." Circulation **107(12)**: 1579-85.
- Boden, G., W. Song, et al. (2007). "In Vivo Effects of Insulin and Free Fatty Acids on Matrix Metalloproteinases in Rat Aorta." Diabetes.
- Brew, K., D. Dinakarpandian, et al. (2000). "Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function." Biochim Biophys Acta **1477(1-2)**: 267-83.
- Brown, D. L., M. S. Hibbs, et al. (1995). "Identification of 92-kD gelatinase in human coronary atherosclerotic lesions. Association of active enzyme synthesis with unstable angina." Circulation **91(8)**: 2125-31.
- Bruemmer, D., A. R. Collins, et al. (2003). "Angiotensin II-accelerated atherosclerosis and aneurysm formation is attenuated in osteopontin-deficient mice." J Clin Invest **112(9)**: 1318-31.
- Burleigh, M. C., A. D. Briggs, et al. (1992). "Collagen types I and III, collagen content, GAGs and mechanical strength of human atherosclerotic plaque caps: span-wise variations." Atherosclerosis **96(1)**: 71-81.
- Chang, L. and M. Karin (2001). "Mammalian MAP kinase signalling cascades." Nature **410(6824)**: 37-40.
- Chase, A. J., M. Bond, et al. (2002). "Role of nuclear factor-kappa B activation in metalloproteinase-1, -3, and -9 secretion by human macrophages in vitro and rabbit foam cells produced in vivo." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22(5)**: 765-71.
- Chen, H., X. Liu, et al. (1996). "DNA bending and unwinding associated with actinomycin D antibiotics bound to partially overlapping sites on DNA." J Mol Biol **258(3)**: 457-79.

- Chow, A. K., J. Cena, et al. (2007). "Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature." Br J Pharmacol **152**(2): 189-205.
- Cipollone, F., M. Fazio, et al. (2005). "Novel determinants of plaque instability." J Thromb Haemost **3**(9): 1962-75.
- Cosaceanu, D., R. A. Budiu, et al. (2007). "Ionizing radiation activates IGF-1R triggering a cytoprotective signaling by interfering with Ku-DNA binding and by modulating Ku86 expression via a p38 kinase-dependent mechanism." Oncogene **26**(17): 2423-34.
- Curry, T. E., Jr., J. S. Mann, et al. (1990). "Alpha 2-macroglobulin and tissue inhibitor of metalloproteinases: collagenase inhibitors in human preovulatory ovaries." Endocrinology **127**(1): 63-8.
- Cusi, K., K. Maezono, et al. (2000). "Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle." J Clin Invest **105**(3): 311-20.
- DeFronzo, R. A. (1997). "Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidaemia and atherosclerosis." Neth J Med **50**(5): 191-7.
- Derosa, G., A. F. Cicero, et al. (2007). "Metalloproteinase-2 and -9 in Diabetic and Nondiabetic Subjects during Acute Coronary Syndromes." Endothelium **14**(1): 45-51.
- Derosa, G., A. D'Angelo, et al. (2007). "Evaluation of metalloproteinase 2 and 9 levels and their inhibitors in diabetic and healthy subjects." Diabetes Metab **33**(2): 129-34.
- Deryugina, E. I. and J. P. Quigley (2006). "Matrix metalloproteinases and tumor metastasis." Cancer Metastasis Rev **25**(1): 9-34.
- Dominguez-Rodriguez, A., P. Abreu-Gonzalez, et al. (2006). "High serum matrix metalloproteinase-9 level predict increased risk of in-hospital cardiac events in patients with type 2 diabetes and ST segment elevation myocardial infarction." Atherosclerosis **196**(1): 365-71.
- Dzau, V. J., R. C. Braun-Dullaeus, et al. (2002). "Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies." Nat Med **8**(11): 1249-56.
- Eckel, R. H., S. M. Grundy, et al. (2005). "The metabolic syndrome." Lancet **365**(9468): 1415-28.
- Falk, E., P. K. Shah, et al. (1995). "Coronary plaque disruption." Circulation **92**(3): 657-71.
- Fang, X., S. Yu, et al. (2000). "Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(22): 11960-5.
- Festa, A., A. J. Hanley, et al. (2003). "Inflammation in the prediabetic state is related to increased insulin resistance rather than decreased insulin secretion." Circulation **108**(15): 1822-30.
- Festa, A., K. Williams, et al. (2006). "The natural course of beta-cell function in nondiabetic and diabetic individuals: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study." Diabetes **55**(4): 1114-20.
- Fischoeder, A., H. Meyborg, et al. (2006). "Insulin augments matrix metalloproteinase-9 expression in monocytes." Cardiovasc Res **73**(4): 841-8.
- Fukuda, D., K. Shimada, et al. (2006). "Comparison of levels of serum matrix metalloproteinase-9 in patients with acute myocardial infarction versus

- unstable angina pectoris versus stable angina pectoris." Am J Cardiol **97**(2): 175-80.
- Fulda, S., E. Meyer, et al. (2000). "Metabolic inhibitors sensitize for CD95 (APO-1/Fas)-induced apoptosis by down-regulating Fas-associated death domain-like interleukin 1-converting enzyme inhibitory protein expression." Cancer Res **60**(14): 3947-56.
- Galazka, G., L. J. Windsor, et al. (1996). "APMA (4-aminophenylmercuric acetate) activation of stromelysin-1 involves protein interactions in addition to those with cysteine-75 in the propeptide." Biochemistry **35**(34): 11221-7.
- Galis, Z. S., G. K. Sukhova, et al. (1995). "Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading proteinases." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(2): 402-6.
- Galis, Z. S., G. K. Sukhova, et al. (1994). "Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques." J Clin Invest **94**(6): 2493-503.
- Ghanim, H., A. Aljada, et al. (2004). "Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state." Circulation **110**(12): 1564-71.
- Glowinska-Olszewska, B. and M. Urban (2007). "Elevated matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 in obese children and adolescents." Metabolism **56**(6): 799-805.
- Gosling, J., S. Slaymaker, et al. (1999). "MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B." J Clin Invest **103**(6): 773-8.
- Gough, P. J., I. G. Gomez, et al. (2006). "Macrophage expression of active MMP-9 induces acute plaque disruption in apoE-deficient mice." J Clin Invest **116**(1): 59-69.
- Gross, J. and C. M. Lapiere (1962). "Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay." Proc Natl Acad Sci U S A **48**: 1014-22.
- Guyton, J. R. and K. F. Klemp (1996). "Development of the lipid-rich core in human atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **16**(1): 4-11.
- Haffner, S. M., A. S. Greenberg, et al. (2002). "Effect of rosiglitazone treatment on nontraditional markers of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus." Circulation **106**(6): 679-84.
- Haffner, S. M., L. Mykkanen, et al. (2000). "Insulin-resistant prediabetic subjects have more atherogenic risk factors than insulin-sensitive prediabetic subjects: implications for preventing coronary heart disease during the prediabetic state." Circulation **101**(9): 975-80.
- Hallenberger, S., V. Bosch, et al. (1992). "Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160." Nature **360**(6402): 358-61.
- Harris, M. I., R. Klein, et al. (1992). "Onset of NIDDM occurs at least 4-7 yr before clinical diagnosis." Diabetes Care **15**(7): 815-9.
- Heymans, S., A. Lutun, et al. (1999). "Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure." Nat Med **5**(10): 1135-42.
- Hsueh, W. A. and R. E. Law (1999). "Insulin signaling in the arterial wall." Am J Cardiol **84**(1A): 21J-24J.
- Hsueh, W. A. and M. J. Quinones (2003). "Role of endothelial dysfunction in insulin resistance." Am J Cardiol **92**(4A): 10J-17J.
- Hu, F. B., M. J. Stampfer, et al. (2002). "Elevated risk of cardiovascular disease prior to clinical diagnosis of type 2 diabetes." Diabetes Care **25**(7): 1129-34.

- Iida, K. T., H. Suzuki, et al. (2002). "Insulin inhibits apoptosis of macrophage cell line, THP-1 cells, via phosphatidylinositol-3-kinase-dependent pathway." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(3): 380-6.
- Ikeda, T., T. Shirasawa, et al. (1993). "Osteopontin mRNA is expressed by smooth muscle-derived foam cells in human atherosclerotic lesions of the aorta." J Clin Invest **92**(6): 2814-20.
- Isganaitis, E. and R. H. Lustig (2005). "Fast food, central nervous system insulin resistance, and obesity." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(12): 2451-62.
- Jarrett, R. J., P. McCartney, et al. (1982). "The Bedford survey: ten year mortality rates in newly diagnosed diabetics, borderline diabetics and normoglycaemic controls and risk indices for coronary heart disease in borderline diabetics." Diabetologia **22**(2): 79-84.
- Jiang, Z. Y., Y. W. Lin, et al. (1999). "Characterization of selective resistance to insulin signaling in the vasculature of obese Zucker (fa/fa) rats." J Clin Invest **104**(4): 447-57.
- Jonas, M., E. R. Edelman, et al. (2005). "Vascular neointimal formation and signaling pathway activation in response to stent injury in insulin-resistant and diabetic animals." Circ Res **97**(7): 725-33.
- Jones, C. B., D. C. Sane, et al. (2003). "Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in acute coronary syndrome." Cardiovasc Res **59**(4): 812-23.
- Jones, G. T., I. P. Kay, et al. (2006). "Elevated plasma active matrix metalloproteinase-9 level is associated with coronary artery in-stent restenosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(7): e121-5.
- Kai, H., H. Ikeda, et al. (1998). "Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes." J Am Coll Cardiol **32**(2): 368-72.
- Kanda, S., M. Kuzuya, et al. (2000). "Matrix metalloproteinase and alphavbeta3 integrin-dependent vascular smooth muscle cell invasion through a type I collagen lattice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(4): 998-1005.
- Kannel, W. B. and D. L. McGee (1979). "Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study." Jama **241**(19): 2035-8.
- Kappert, K., H. Meyborg, et al. (2008). "Insulin facilitates monocyte migration: a possible link to tissue inflammation in insulin-resistance." Biochem Biophys Res Commun **365**(3): 503-8.
- Katsuda, S., Y. Okada, et al. (1994). "Matrix metalloproteinase-9 (92-kd gelatinase/type IV collagenase equals gelatinase B) can degrade arterial elastin." Am J Pathol **145**(5): 1208-18.
- Khan, B. V., S. S. Parthasarathy, et al. (1995). "Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells." J Clin Invest **95**(3): 1262-70.
- Kleiner, D. E. and W. G. Stetler-Stevenson (1994). "Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases." Anal Biochem **218**(2): 325-9.
- Kockx, M. M. and A. G. Herman (1998). "Apoptosis in atherogenesis: implications for plaque destabilization." Eur Heart J **19 Suppl G**: G23-8.
- Kohro, T., T. Tanaka, et al. (2004). "A comparison of differences in the gene expression profiles of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiated THP-1 cells and human monocyte-derived macrophage." J Atheroscler Thromb **11**(2): 88-97.

- Kol, A., G. K. Sukhova, et al. (1998). "Chlamydial heat shock protein 60 localizes in human atheroma and regulates macrophage tumor necrosis factor-alpha and matrix metalloproteinase expression." Circulation **98**(4): 300-7.
- Lai, W. C., M. Zhou, et al. (2003). "Differential regulation of lipopolysaccharide-induced monocyte matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-9 by p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinases." J Immunol **170**(12): 6244-9.
- Leber, T. M. and F. R. Balkwill (1998). "Regulation of monocyte MMP-9 production by TNF-alpha and a tumour-derived soluble factor (MMPSF)." Br J Cancer **78**(6): 724-32.
- LeRoith, D., H. Werner, et al. (1995). "Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor." Endocr Rev **16**(2): 143-63.
- Li, G., E. J. Barrett, et al. (2005). "Insulin at physiological concentrations selectively activates insulin but not insulin-like growth factor I (IGF-I) or insulin/IGF-I hybrid receptors in endothelial cells." Endocrinology **146**(11): 4690-6.
- Liang, C. P., S. Han, et al. (2004). "Increased CD36 protein as a response to defective insulin signaling in macrophages." J Clin Invest **113**(5): 764-73.
- Libby, P. (2006). "Inflammation and cardiovascular disease mechanisms." Am J Clin Nutr **83**(2): 456S-460S.
- Lindstedt, K. A., M. J. Leskinen, et al. (2004). "Proteolysis of the pericellular matrix: a novel element determining cell survival and death in the pathogenesis of plaque erosion and rupture." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(8): 1350-8.
- Lyon, C. J., R. E. Law, et al. (2003). "Minireview: adiposity, inflammation, and atherogenesis." Endocrinology **144**(6): 2195-200.
- Marx, N., J. Froehlich, et al. (2003). "Antidiabetic PPAR gamma-activator rosiglitazone reduces MMP-9 serum levels in type 2 diabetic patients with coronary artery disease." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(2): 283-8.
- Matias-Roman, S., B. G. Galvez, et al. (2005). "Membrane type 1-matrix metalloproteinase is involved in migration of human monocytes and is regulated through their interaction with fibronectin or endothelium." Blood **105**(10): 3956-64.
- McCawley, L. J., S. Li, et al. (1999). "Sustained activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. A mechanism underlying receptor tyrosine kinase specificity for matrix metalloproteinase-9 induction and cell migration." J Biol Chem **274**(7): 4347-53.
- Menshikov, M., E. Elizarova, et al. (2002). "Urokinase upregulates matrix metalloproteinase-9 expression in THP-1 monocytes via gene transcription and protein synthesis." Biochem J **367**(Pt 3): 833-9.
- Menshikov, M., N. Torosyan, et al. (2006). "Urokinase induces matrix metalloproteinase-9/gelatinase B expression in THP-1 monocytes via ERK1/2 and cytosolic phospholipase A2 activation and eicosanoid production." J Vasc Res **43**(5): 482-90.
- Mohammed, F. F., D. S. Smookler, et al. (2003). "Metalloproteinases, inflammation, and rheumatoid arthritis." Ann Rheum Dis **62** **Suppl 2**: ii43-7.
- Molavi, B., J. Chen, et al. (2006). "Cardioprotective effects of rosiglitazone are associated with selective overexpression of type 2 angiotensin receptors and inhibition of p42/44 MAPK." Am J Physiol Heart Circ Physiol **291**(2): H687-93.
- Montagnani, M., I. Golovchenko, et al. (2002). "Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase enhances mitogenic actions of insulin in endothelial cells." J Biol Chem **277**(3): 1794-9.

- Morgunova, E., A. Tuuttila, et al. (1999). "Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: activation mechanism revealed." Science **284**(5420): 1667-70.
- Murphy, G. and A. J. Docherty (1992). "The matrix metalloproteinases and their inhibitors." Am J Respir Cell Mol Biol **7**(2): 120-5.
- Nagase, H., R. Visse, et al. (2006). "Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs." Cardiovasc Res **69**(3): 562-73.
- Newby, A. C. (2005). "Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture." Physiol Rev **85**(1): 1-31.
- Nigro, J., N. Osman, et al. (2006). "Insulin resistance and atherosclerosis." Endocr Rev **27**(3): 242-59.
- Ozaki, H., Y. Miyashita, et al. (2005). "Enhancement of MMP-9 activity in THP-1 cells by 7-ketocholesterol and its suppression by the HMG-CoA reductase inhibitor fluvastatin." J Atheroscler Thromb **12**(6): 308-14.
- Pandolfi, A., A. Solini, et al. (2005). "Selective insulin resistance affecting nitric oxide release but not plasminogen activator inhibitor-1 synthesis in fibroblasts from insulin-resistant individuals." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(11): 2392-7.
- Pullen, N. and G. Thomas (1997). "The modular phosphorylation and activation of p70s6k." FEBS Lett **410**(1): 78-82.
- Pyorala, M., H. Miettinen, et al. (2000). "Insulin resistance syndrome predicts the risk of coronary heart disease and stroke in healthy middle-aged men: the 22-year follow-up results of the Helsinki Policemen Study." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(2): 538-44.
- Reaven, G. M. (1995). "Pathophysiology of insulin resistance in human disease." Physiol Rev **75**(3): 473-86.
- RKI (2006). "Zur Verbreitung von Übergewicht und Adipositas bei Kindern und Jugendlichen." Epidemiologisches Bulletin **40.06**: 347.
- Robinson, S. C., K. A. Scott, et al. (2002). "Chemokine stimulation of monocyte matrix metalloproteinase-9 requires endogenous TNF-alpha." Eur J Immunol **32**(2): 404-12.
- Ross, R. (1999). "Atherosclerosis--an inflammatory disease." N Engl J Med **340**(2): 115-26.
- Roy, R., B. Zhang, et al. (2006). "Making the cut: protease-mediated regulation of angiogenesis." Exp Cell Res **312**(5): 608-22.
- Sampson, M. J., I. R. Davies, et al. (2003). "Increased expression of a scavenger receptor (CD36) in monocytes from subjects with Type 2 diabetes." Atherosclerosis **167**(1): 129-34.
- Schneider, D. J., P. M. Absher, et al. (1997). "Dependence of augmentation of arterial endothelial cell expression of plasminogen activator inhibitor type 1 by insulin on soluble factors released from vascular smooth muscle cells." Circulation **96**(9): 2868-76.
- Schwartz, E. A. and P. D. Reaven (2006). "Molecular and signaling mechanisms of atherosclerosis in insulin resistance." Endocrinol Metab Clin North Am **35**(3): 525-49, viii.
- Seidah, N. G. and M. Chretien (1999). "Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides." Brain Res **848**(1-2): 45-62.
- Shah, P. K. (1998). "Role of inflammation and metalloproteinases in plaque disruption and thrombosis." Vasc Med **3**(3): 199-206.

- Stawowy, P. and E. Fleck (2005). "Proprotein convertases furin and PC5: targeting atherosclerosis and restenosis at multiple levels." J Mol Med **83**(11): 865-75.
- Stawowy, P., H. Kallisch, et al. (2005). "Immunohistochemical localization of subtilisin/kexin-like proprotein convertases in human atherosclerosis." Virchows Arch **446**(4): 351-9.
- Stawowy, P., H. Kallisch, et al. (2004). "Proprotein convertases regulate insulin-like growth factor 1-induced membrane-type 1 matrix metalloproteinase in VSMCs via endoproteolytic activation of the insulin-like growth factor-1 receptor." Biochem Biophys Res Commun **321**(3): 531-8.
- Stawowy, P., C. Margeta, et al. (2004). "Regulation of matrix metalloproteinase MT1-MMP/MMP-2 in cardiac fibroblasts by TGF-beta1 involves furin-convertase." Cardiovasc Res **63**(1): 87-97.
- Stawowy, P., H. Meyborg, et al. (2005). "Furin-like proprotein convertases are central regulators of the membrane type matrix metalloproteinase-pro-matrix metalloproteinase-2 proteolytic cascade in atherosclerosis." Circulation **111**(21): 2820-7.
- Strongin, A. Y., I. Collier, et al. (1995). "Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease." J Biol Chem **270**(10): 5331-8.
- Thomas, G. (2002). "Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(10): 753-66.
- Thong, F. S., C. B. Dugani, et al. (2005). "Turning signals on and off: GLUT4 traffic in the insulin-signaling highway." Physiology (Bethesda) **20**: 271-84.
- Uddin, S., E. N. Fish, et al. (1997). "The IRS-pathway operates distinctively from the Stat-pathway in hematopoietic cells and transduces common and distinct signals during engagement of the insulin or interferon-alpha receptors." Blood **90**(7): 2574-82.
- Ullrich, A., A. Gray, et al. (1986). "Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity." Embo J **5**(10): 2503-12.
- Van den Steen, P. E., B. Dubois, et al. (2002). "Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)." Crit Rev Biochem Mol Biol **37**(6): 375-536.
- Van Wart, H. E. and H. Birkedal-Hansen (1990). "The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(14): 5578-82.
- Vander Haar, E., S. I. Lee, et al. (2007). "Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40." Nat Cell Biol **9**(3): 316-23.
- Virmani, R., F. D. Kolodgie, et al. (2000). "Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(5): 1262-75.
- Vu, T. H. and Z. Werb (2000). "Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology." Genes Dev **14**(17): 2123-33.
- Wagsater, D., C. Zhu, et al. (2009). "Effects of PDGF-C and PDGF-D on monocyte migration and MMP-2 and MMP-9 expression." Atherosclerosis **202**(2): 415-23.
- Wang, C. C., I. Gurevich, et al. (2003). "Insulin affects vascular smooth muscle cell phenotype and migration via distinct signaling pathways." Diabetes **52**(10): 2562-9.

-
- Weber, C., A. Schober, et al. (2004). "Chemokines: key regulators of mononuclear cell recruitment in atherosclerotic vascular disease." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(11): 1997-2008.
- Welham, M. J., H. Bone, et al. (1997). "Insulin receptor substrate-2 is the major 170-kDa protein phosphorylated on tyrosine in response to cytokines in murine lymphohemopoietic cells." J Biol Chem **272**(2): 1377-81.
- Weyer, C., R. L. Hanson, et al. (2000). "A high fasting plasma insulin concentration predicts type 2 diabetes independent of insulin resistance: evidence for a pathogenic role of relative hyperinsulinemia." Diabetes **49**(12): 2094-101.
- Wilcox, J. N., N. A. Nelken, et al. (1994). "Local expression of inflammatory cytokines in human atherosclerotic plaques." J Atheroscler Thromb **1 Suppl 1**: S10-3.
- Wong, B., W. C. Lumma, et al. (2001). "Statins suppress THP-1 cell migration and secretion of matrix metalloproteinase 9 by inhibiting geranylgeranylation." J Leukoc Biol **69**(6): 959-62.
- Xu, X. P., S. R. Meisel, et al. (1999). "Oxidized low-density lipoprotein regulates matrix metalloproteinase-9 and its tissue inhibitor in human monocyte-derived macrophages." Circulation **99**(8): 993-8.
- Zeigler, M. E., Y. Chi, et al. (1999). "Role of ERK and JNK pathways in regulating cell motility and matrix metalloproteinase 9 production in growth factor-stimulated human epidermal keratinocytes." J Cell Physiol **180**(2): 271-84.
- Zeng, G., F. H. Nystrom, et al. (2000). "Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells." Circulation **101**(13): 1539-45.
- Zoppini, G., P. Galante, et al. (1994). "Phosphotyrosine protein profiles in monocytes after insulin and IGF-1 stimulation." Eur J Clin Invest **24**(4): 275-8.

8. Danksagung

Meinem Betreuer und Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. Philipp Stawowy, danke ich herzlich für die Bereitstellung des Themas. Besonders bedanken möchte ich mich für sein hervorragendes Engagement beim umfangreichen Heranführen an das Thema der Promotion, an das exakte wissenschaftliche Arbeiten und die Diskussionen und wertvollen Ideen.

Bedanken möchte ich mich bei Frau Dipl.-Ing. Heike Meyborg für die kompetente Heranführung an die Methodik und die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Dietger Stibenz möchte für seine Unterstützung bei der Durchflusszytometrie danken.

Für die freundliche und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe im kardiologischen Forschungslabor des Deutschen Herzzentrums danken.

Mir bleibt nichts zu tun, außer Danke zu sagen: Hannah Antonia, SK und Marek.

Allermeister Dank gilt meinen Eltern für ihre unermüdliche Unterstützung während meines Medizinstudiums und die aufmunternde Geduld.

9. Lebenslauf

„Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.“

10. Erklärung

„Ich, Arne Fiscoeder, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Regulation von Matrix Metalloproteinase-9 durch Insulin in humanen THP-1 Monozyten“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift