

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

DISSERTATION

Die Bedeutung von Insulin-like Growth Factor-1 für die Integrin-
vermittelte Migration von humanen THP-1/Makrophagen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Jan Fritzsche
aus Chemnitz

Gutachter:

1. PD Dr. med. Philipp Stawowy
2. Prof. Dennis Bruemmer, M.D.
3. PD Dr. Stephan Rosenkranz

Datum der Promotion: 18.11.2011

Meinen Eltern gewidmet

1. Einleitung	5
1.1. Atherosklerose und Makrophagen	5
1.2 Die Interaktion von Integrinen, Matrix Metalloproteinasen und Tyrosinkinaserzeptoren in der Entstehung und Progression der Atherosklerose	8
2. Fragestellung und Ziele	15
3. Material und Methoden	16
3.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien	16
3.2. Chemikalien und Antikörper	17
3.4. Proteinextraktion und Proteinbestimmung	20
3.5. SDS-Gelelektrophorese und Western Blot	21
3.8. Checkerbox und Migrationsassay	25
3.9. Furin Aktivitätsassay	25
3.10. MIP-1 α und TNF- α ELISA	26
3.11. Datenanalyse	27
4. Ergebnisse	28
4.1. Die Regulation des IGF-1 Rezeptors, α_v Integrin und Furin während der Monozyten \rightarrow Makrophagendifferenzierung.....	28
4.2 Die IGF-1 induzierte Migration von THP-1/Makrophagen wird durch Integrine vermittelt.....	31
4.5 IGF-1 Rezeptorsignaling aktiviert <i>PI-3 Kinase, PKC- und p38</i> <i>MAP-Kinase</i> Signaltransduktionswege	42
4.6 IGF-1 induziert die Migration von THP-1/Makrophagen durch Integrin <i>inside-out</i> Aktivierung	45
4.7 Einfluss von IGF-1 auf die Sekretion von MIP-1 α und TNF- α	48
5. Diskussion.....	50
6. Zusammenfassung	58
7. Literaturverzeichnis.....	59
8. Abkürzungsverzeichnis	65
9. Danksagung.....	66
Selbstständigkeitserklärung	68

1. Einleitung

1.1. Atherosklerose und Makrophagen

Während die Mortalität kardiovaskulärer Erkrankungen in den vergangenen Jahren in der westlichen Welt dank intensiver medikamentöser Behandlung der Risikofaktoren und Innovationen in der Arzneimitteltherapie sank, nimmt die globale Morbidität durch kardiovaskuläre Erkrankungen insbesondere in Ländern Lateinamerikas, Afrikas und des Nahen Ostens zu [1; 2].

Dies ist begleitet von einer zunehmenden Urbanisierung in diesen Regionen und damit einhergehenden sozioökonomischen Veränderungen, welche ultimativ zu einer starken Zunahme kardiovaskulärer Risikofaktoren wie Nikotinabusus, Fettstoffwechselstörungen, Adipositas und Diabetes Mellitus führen [2].

Diese Risikofaktoren sind pathogenetisch verbunden mit der Entstehung der Atherosklerose, bei der es sich um eine chronisch-fortschreitende Entzündung der Gefäßwände mit nachfolgender Immunantwort handelt [3]. Inflammatorische mononukleäre Zellen stellen den entscheidenden Zelltyp in der Entstehung und Progression der Atherosklerose dar [4].

Li et al. [5] zeigten erstmals in tierexperimentellen Versuchen an Kaninchen, dass Endothelzellen als Antwort auf einen erhöhten Serumcholesterinspiegel das Adhäsionsmolekül *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) exprimieren. Gefolgt von der Expression von VCAM-1 konnte eine Infiltration der Intima durch Makrophagen histologisch nachgewiesen werden [5]. Andere Arbeitsgruppen zeigten in *in vitro*-Studien, dass modifizierte Lipoproteinpartikel in Endothelzellen durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie Nuclear Factor-KappaB (NF- κ B) via Stimulation mit Interleukin-1 oder Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) eine Entzündungsantwort induzieren, die dann in der Expression und Aktivierung von VCAM-1 mündet [6]. Diese Untersuchungen sind somit die ersten Hinweise auf einen kausalen Zusammenhang zwischen Hypercholesterinämie und Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, was die Adhäsion von inflammatorischen mononukleären Zellen begünstigt und von deren Diapedese und Intimainfiltration gefolgt ist [7].

Die Motilität inflammatorischer mononukleärer Zellen in der Gefäßwand hängt dabei von der Wirkung chemotaktischer Zytokine/Chemokine, der Expression mitogener Wachstumsfaktoren als auch von deren Rezeptoren ab [3; 8].

So ist das Chemokin Monocyte Chemoattractant Proteine-1 (MCP-1) beispielsweise stark in humanen Läsionen exprimiert [4]. Unterstützt wird diese These durch experimentelle *in vivo* Untersuchungen an ApoE-defizienten Mäusen, denen zusätzlich der MCP-1 Rezeptor CCR2 durch Gen-Knockout fehlte [9]. In diesen Tieren fand sich eine wesentlich geringere Akkumulation von Monozyten und Lipiden [9].

Der Prozess der Diapedese ist auch charakterisiert durch die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen [4]. Durch diese Veränderung bilden die Zellen einen aggressiveren Phänotyp aus, welcher sie dann befähigt, an der chronisch-progredienten Entzündungsreaktion in der Atherosklerose teilzunehmen [4]. Gefolgt ist die phänotypische Differenzierung von der Aufnahme und Akkumulation von Lipoproteinen [8]. Diese bilden in Makrophagen zytoplasmatische Einschlüsse, bei denen es sich um Cholesterolester und oxidierte Formen von *low-density* Lipoprotein (LDL) handelt, wodurch sie ihr charakteristisches „schaumiges“ Aussehen bekommen [4]. Diese überschießende Akkumulation von Lipiden und Bildung von Schaumzellen kann als Folge einer Expression von Rezeptoren für modifizierte Lipoproteine (Scavenger Rezeptoren A und CD36) gesehen werden; diese Rezeptoren unterliegen im Gegensatz zum LDL Rezeptor keinem schützend-limitierenden Regelkreis mehr [8].

Die Produktion von Apoptose-induzierenden Mediatoren wie z.B. p53 Protein durch aktivierte Makrophagen begünstigt den Untergang vaskulärer glatter Gefäßmuskelzellen (VSMCs) und damit die Destabilisierung der Plaquekappe [10]. Der Untergang Lipid-beladener Makrophagen dagegen ist verantwortlich für die Entstehung eines nekrotischen Kerns im Plaque sowie für dessen Progression durch Akkumulation von freiem Cholesterin [11].

Begleitet werden diese Prozesse durch Ab- und Umbauvorgänge der extrazellulären Matrix (EZM), insbesondere durch proteolytische Enzyme wie Matrix Metalloproteinasen (MMPs), gebildet von Makrophagen [10].

Die Folge ist die Ruptur der Plaquekappe mit nachfolgender Thrombusbildung und daraus resultierendem Gefäßverschluss, der häufigsten Ursache des

Myokardinfarktes [12]. Autopsiestudien an Menschen zeigten, dass das Vorhandensein von Makrophagen hierbei direkt mit der Plaqueprogression und Ruptur korreliert [11].

1.2 Die Interaktion von Integrinen, Matrix Metalloproteinasen und Tyrosinkinase Rezeptoren in der Entstehung und Progression der Atherosklerose

Integrine stellen die Verbindung von Zytoskelett und EZM her, sie fungieren als Signalbrücke, indem sie Mechanotransduktion [13] und bidirektionale Signaltransduktion [14] ermöglichen. Sie sind darüber hinaus für Adäsion und Migration, Zytoskelett-Organisation, Proliferation, Differenzierung und Überleben der Zellen von großer Bedeutung [15].

Integrine sind Transmembranrezeptoren, bestehend aus über 15 α und 8 β Untereinheiten, die in einer Vielzahl unterschiedlicher Kombinationen miteinander heterodimerisieren können [15]. Unter bidirektionaler Signaltransduktion versteht man die Kommunikation zwischen Zellen und Extrazellularraum durch *outside-in* und *inside-out signaling* [16]. *Outside-in signaling* beschreibt dabei einen Prozess, bei dem es durch Integrinbindung von extrazellulären Matrixproteinen zur Phosphorylierung Integrin-abhängiger Nicht-Rezeptortyrosinkinasen wie z.B. der Fokalen Adhäsionskinase (FAK) sowie Paxillin und hiervon abhängiger Signaltransduktionswege kommt [16]. Besonders in der Gruppe der α_v Integrine kommt es dabei über weitere Signaltransduktionswege wie z.B. *Phosphoinositol-3 Kinase (PI-3 Kinase)* zur Adhäsion und Migration der Zelle [14].

Im Gegensatz zu diesem "klassischen" Modell der Integrinaktivierung, gekennzeichnet durch deren Interaktion mit Proteinen des Extrazellularraums, kommt es beim *inside-out signaling* durch die Aktivierung von Wachstumsfaktorrezeptoren und nachfolgender Induktion von Rezeptortyrosinkinasen sowie konsekutiver Signaltransduktionswege wie *Proteinkinase C (PKC)* zur Modellierung der Affinität und Avidität von Integrinen [17]. Die resultierende Optimierung der Integrin-Substrat-Interaktion führt beispielsweise via *PKC* Aktivierung über die Phosphorylierung der β_1 Integrin Untereinheit zur gesteigerten Avidität gegenüber extrazellulärem Kollagen-1 [17].

Das Integrin α_v kann mit einer von fünf möglichen β Ketten (β_1 , β_3 , β_5 , β_6 , β_8) heterodimerisieren und erkennt als Heterodimer die Aminosäuresequenz

RGD (Arginin-Glycin-Aspartat) von extrazellulären Liganden wie Vitronektin, Fibronektin oder Osteopontin [15].

Integrin $\alpha v \beta 3$ findet sich in atherosklerotischen Läsionen z.B. in glatten Gefäßmuskelzellen, Monozyten bzw. Makrophagen unterschiedlich exprimiert; in intakten Arterien findet es sich vor allem auf Endothelzellen [18]. Weerasinghe et al. [19] konnten zeigen, dass $\alpha v \beta 3$ Integrin die Adhäsion von Monozyten an ICAM-1 von Endothelzellen moduliert und dass $\beta 3$ Integrin-defiziente Makrophagen eine signifikant geringe Transmigration durch die Endothelbarriere aufwiesen. In tierexperimentellen Modellen konnte durch spezifische Hemmung von αv Integrinen durch spezifische blockierende Antikörper gegen Vitronektin, $\alpha v \beta 3$ oder $\alpha v \beta 5$ sowohl die Neointimabildung als auch die Infiltration der Gefäßwände durch Makrophagen verhindert werden [20; 21; 22].

Zellmotilität setzt auch die Unterstützung der Integrine durch Matrix Metalloproteinasen (MMPs) voraus. Diese bilden eine heterogene Gruppe von mehr als 20 beim Menschen identifizierter Zink-abhängiger Enzymen, welche als Gesamtheit betrachtet in der Lage sind nahezu jegliche Moleküle des Extrazellulärraums zu spalten [23; 24]. Sie gehören damit zu den wichtigsten proteolytischen Enzymen im Interstitium. Die Induktion und Sekretion dieser Enzyme wird wesentlich durch Chemokine und Wachstumsfaktoren gesteuert; Makrophagen sind bedeutende Produzenten [23].

Entsprechend der Art ihrer Aktivierung kann man die MMPs vereinfacht in von der Zelle sezernierte und an die Zellmembran gebundene Enzyme einteilen. Die löslichen MMPs werden hauptsächlich als Zymogene von der Zelle abgegeben und werden erst extrazellulär durch proteolytische Spaltung aktiviert, z.B. von anderen MMPs oder Proteasen wie Plasmin und Thrombin [25]. Membranständige MMPs werden intrazellulär von Proprotein Convertasen aktiviert und dann an die Zellmembran gebunden, so dass ihre Aktivität auf den perizellulären Raum beschränkt ist [24; 25; 26]. Von den derzeit identifizierten sechs membrangebundenen MMPs (MT-MMPs), findet sich MT5-MMP nur im zentralen Nervensystem und MT6-MMP besonders auf Tumorzellen und Leukozyten [25].

Alle Zelltypen, die sich im humanen Plaque finden, können zwar prinzipiell MMP sezernieren, jedoch kommt Makrophagen eine Schlüsselfunktion zu. Gewebeuntersuchungen konnten einen Zusammenhang zwischen rupturgefährdeten atherosklerotischen Läsionen, Akkumulation von Makrophagen sowie einer gesteigerter Aktivität von MMPs nachweisen [25]. Insbesondere konnte eine erhöhte Expression von MMP-1, -2, -9 und -14 in makrophagenreichen Regionen der Plaque identifiziert werden [23]. *In vitro* Studien konnten zeigen, dass die Migration von Monozyten aus dem Blut durch die Endothelbarriere über MT1-MMP vermittelt wird [27].

Neben der Spaltung extrazellulärer Matrixproteine ist MT1-MMP an der Aktivierung von pro-MMP-2 beteiligt [24]. Pro-MMP-2 wird vor allem von glatten Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten sezerniert [28]. Für seine Aktivierung ist ein Multiproteinkomplex auf der Zellmembran notwendig, er besteht aus zwei Molekülen MT1-MMP, einem TIMP-2 Molekül und pro-MMP-2 [24]. Das Verhältnis von MMPs zu TIMP-2 entscheidet dabei über Aktivierung bzw. Hemmung des pro-MMP-2 Moleküls dieses Multiproteinkomplexes [24].

Für die Beteiligung der MMPs an der Progression und Komplikation der Plaqueregion spricht außerdem, dass in verschiedenen klinischen Studien eine Assoziation zwischen erhöhtem Plasmaspiegel von MMP-2 und MMP-9 und dem akuten Koronarsyndrom (ACS) gezeigt werden konnte [29].

Da eine balancierte Aktivität der Matrix Metalloproteinasen für ein physiologisch adäquates Milieu sowie für das Zusammenspiel von Zellen und Gewebe essentiell ist, werden sie streng reguliert [23; 24]. MMP-Aktivierung kann einerseits durch Gentranskription oder proteolytische Aktivierung der Proenzyme gesteigert werden. Andererseits kann über stöchiometrische 1:1 Bindung an endogenen Inhibitoren – den vier beim Menschen bekannten *tissue inhibitors of metalloproteases* (TIMP-1, -2, -3, -4) – eine Hemmung erfolgen [23].

Die Bedeutung der Interaktion von MMPs und Integrinen zeigt sich unter anderem an der Bindung von MMPs an Integrine, welche notwendig ist zur Koordinierung von Degradation der EZM und Zellmotilität [30]. So wurde

gezeigt, dass in humanen Monozyten die $\alpha 4\beta 1$ und $\alpha 5\beta 1$ Integrinbindung an Fibronectin die Expression von membran-gebundenem MT1-MMP steigert [27]. Weiterhin hemmte die Inhibition von MT1-MMP mittels blockierendem Antikörper die MCP-1 induzierte Migration von Monozyten [27]. Somit regulieren Integrine MMPs, die wiederum wichtig für die Invasion sind.

Weiterhin spielen Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren für die Progression der Atherosklerose eine bedeutende Rolle, denn sie regulieren vor allem Proteinbiosynthese, Proliferation und Chemotaxis [8], ein typisches Beispiel dafür ist Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) und sein Rezeptor IGF-1R. Die Rolle von IGF-1/IGF-1R bei der Atherosklerose ist dabei kontrovers einzuschätzen, da sowohl atheroprotektive wie atherogene Funktionen beschrieben wurden. Der Plasmaspiegel von IGF-1 wird unter Kontrolle von Wachstumshormon (GH) hauptsächlich durch die Synthese in der Leber bestimmt, wodurch es seine endokrinen Funktionen wie Wachstum und Modifikation von Entwicklung und Differenzierung wahrnehmen kann [31]. Darüber hinaus kann IGF-1 von nahezu allen Geweben synthetisiert werden und besonders seine autokrine und parakrine Sekretion von mononukleären Zellen in Thymus, lymphatischen Organen und auch Entzündungsorten sowie bei Tumoren sind von Bedeutung [31]. Unabhängig vom Plasmaspiegel kann IGF-1 also streng regional begrenzt hohe Konzentrationen erreichen und damit organspezifische Wirkungen ausführen, ohne z.B. die Glukosehomeostase zu beeinflussen [31]. IGF-1 vermittelt seine Wirkung durch Bindung an den IGF-1R [31]. Die sechs IGF Bindungsproteine (IGFBPs) modulieren diese Interaktion, in dem sie als IGF-1 Transporterproteine fungieren können und IGF-1 auch direkt hemmen oder die Rezeptorbindung verstärken können [31].

Der IGF-1R ist ein Heterotetramer bestehend aus zwei extrazellulären α -Ketten und zwei intrazellulären β -Ketten [31]. Die β -Ketten sind mit einer Tyrosinkinase Domäne verbunden, die bei Rezeptorligandenbindung autophosphoryliert [31]. Daran schließen sich Phosphorylierungen von verschiedenen Signalproteinen wie z.B. Insulin Rezeptor Substrat-1 (IRS-1)

bis -4 und Shc an, welche in der Aktivierung von Transduktionswegen wie *PI-3 Kinase*, *Akt* oder *Ras-Raf-ERK-1/2* münden [31].

Die Synthese des IGF-1R erfolgt durch Translation am endoplasmatischen Retikulum, die weitere Prozessierung findet am *trans*-Golgi Netzwerk (*TGN*) statt, wo er durch endoproteolytische Spaltung durch die Proprotein Convertase Furin aktiviert wird. Dabei wird aus dem etwa 200 kDa großen Präkursorprotein des IGF-1R an der dibasischen Aminosäuresequenz *RVRR* (Arginin-Lysin-Arginin-Arginin) die β - von der α -Untereinheit getrennt, die beiden Untereinheiten durch Disulfidbrücken verbunden und der Rezeptor dann zur Zellmembran transportiert (Abb.1) [32].

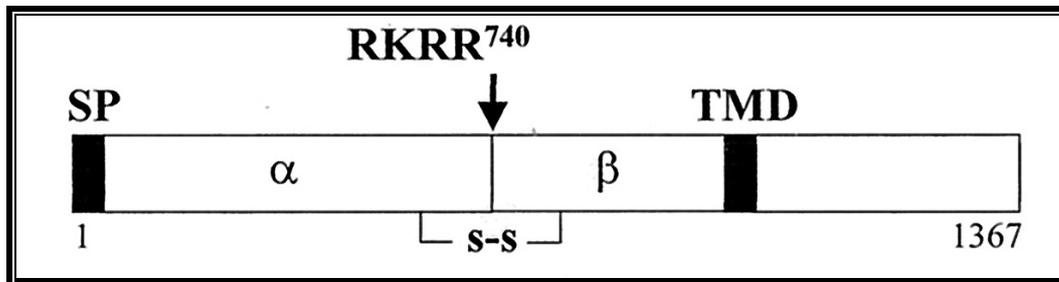


Abb.1: Schematische Darstellung der Peptidsequenz der endoproteolytischen Aktivierung des Pro-IGF-1R durch Furin (modifiziert nach Khatib [32])

Proprotein Convertasen sind Enzyme, die inaktive Vorstufen von Proteinen durch limitierte endoproteolytische Spaltung aktivieren. Ein Beispiel hierfür ist die Aktivierung von Insulin aus Proinsulin unter Abspaltung des C-Peptides, welches durch die Proprotein Convertase PC1 erfolgt [33]. Somit bilden Propeptide und deren aktivierende Proprotein Convertasen eine funktionelle Einheit zur Synthese biologisch aktiver Substanzen.

Beim Menschen wurden bisher sieben verschiedene Proprotein Convertasen (PCs) charakterisiert (PC1/3, PC2, PC4, PC5/6, PC7, Furin, PACE4). Als kalziumabhängige Serin Endoproteinasen sind diese strukturell mit dem bakteriellen Subtilisin und dem aus Hefe stammenden Kexin verwandt, weswegen sie auch als Subtilisin/Kexin-ähnliche Protein Convertasen zusammengefasst werden. Sie aktivieren Proproteine an Sitzen dibasischer Aminosäuren mit dem generellen Motiv: (Arg/Lys)-(Xn)-(Arg/Lys)_↓ (X kann

jede Aminosäure darstellen) [34]. Die PCs sind grundsätzlich in allen Geweben zu finden, wobei sie jedoch in unterschiedlicher Expression und Kombination verteilt sind. Ihr Bestimmungsort, an dem die Aktivierung der Proproteine stattfindet, ist in der Regel das *trans*-Golgi Network (Furin, PC7, PACE4) und/oder sekretorische Granula (PC1/3, PC2, PC5/6) sowie die Zellmembran (Furin, PC5/6) [35].

Aufgrund ihrer potentiellen Substrate wie Pro-TGF- β , Pro-MT1-MMP, Pro-IGF-1R ist es vorstellbar, dass PCs wie Furin eine wichtige Rolle in der Entstehung und Progression der Atherosklerose spielen könnten [26; 36; 37; 38]. Pathologisch-anatomische Untersuchungen an humanen atherosklerotischen Läsionen zeigten, dass Furin in fortgeschrittenen, rupturgefährdeten Läsionen vor allem in Makrophagen stark exprimiert wird [39]. Daneben ist IGF-1/IGF-1R in humanen atherosklerotischen Läsionen hoch exprimiert [40]. Während der Progression der Atherosklerose konnten erhöhte Plasmaspiegel von IGF-1 und IGFBP-3 in Patienten gefunden werden [41]. Experimentelle *in vivo* Studien konnten eine verstärkte Neointimabildung infolge von IGF-1 Überexpression in vaskulären glatten Muskelzellen (VSMCs) zeigen [42], die Hemmung des IGF-1R mittels eines IGF-1 ähnlichen Peptides führte bei Restenosemodellen an Ratten zur Neointimareduktion [43].

In Tumorzellen induziert IGF-1 deren Migration durch die Aktivierung von Integrinen und auch MMPs. Zhang et al. [44] konnten zeigen, dass IGF-1 die MT1-MMP/MMP-2 Aktivierungskaskade bei Lungenkarzinomzellen induziert, wohingegen Marelli et al. [45] zeigten, dass IGF-1 die Migration von humanen androgen-unabhängigen Prostatatumorzellen vor allem durch Integrinaktivierung begünstigt. Die Autoren zeigten, dass es infolge von IGF-1 Stimulation zu einer Aktivierung des IGF-1R und damit einhergehend zur Aktivierung von *PI-3 Kinase* kommt [45]. Dies führte zum Rearrangement des Aktin Zytoskeletts und zur Steigerung der Expression des $\alpha v \beta 3$ Integrins [45]. Neben dem Einfluss auf die Zellmotilität konnten Barfield et al. [46] veranschaulichen, dass es infolge von IGF-1 Stimulation in glomerulären Mesangiumszellen bei Ratten zu einer gesteigerten Schaumzellbildung bei

cholesterin- und fettreicher Diät kommt. Auch bei murinen Makrophagen konnten *in vivo* Versuche eine gesteigerte Aufnahme von LDL durch IGF-1 Stimulation nachweisen [47]. Eine weitere pro-inflammatorische Wirkung zeigte sich durch IGF-1 Stimulation bei murinen Makrophagen in einer erhöhten Zytokinsekretion [48].

Dies lässt vermuten, dass IGF-1 sowohl auf Integrine als auch auf MMPs, die Cholesterinaufnahme in Makrophagen und deren Zytokinsekretion Wirkung hat, also auf Funktionen, die in der Pathogenese der Atherosklerose von großer Bedeutung sind.

Im Gegensatz zu diesen proatherogenen Funktionen zeigten Bai et al. [49] jedoch eine über *PI-3 Kinase* vermittelte anti-apoptotische Wirkung von IGF-1 auf glatte Gefäßmuskelzellen. Des Weiteren untersuchten Haylor et al. [50] renale Vasoregulationsprozesse und zeigten eine durch IGF-1 induzierte Steigerung der NO Synthase, die in eine NO-vermittelte Vasodilatation und Plättchen-hemmende Funktion mündete.

2. Fragestellung und Ziele

IGF-1 und IGF-1R finden sich gesteigert in humanen atherosklerotischen Läsionen exprimiert. Im Tiermodell führt die Überexpression von IGF-1 zur gesteigerten Neointimabildung, die Inhibition von IGF-1 verhindert die Restenose signifikant. *In vitro* Untersuchungen haben darüber hinaus gezeigt, dass IGF-1 anti-apoptotische Wirkung in glatten Gefäßmuskelzellen besitzt, aber auch Zellmotilität in Tumorzellen via Aktivierung von Integrinen und/oder MMPs steigert. Die Bedeutung von IGF-1 für essentielle Funktionen von Makrophagen, wie Motilität und Zytokinsekretion ist bisher jedoch weitgehend unbekannt.

Das Ziel dieser Arbeit war daher die chemotaktische Potenz von IGF-1 in Makrophagen zu untersuchen. Weiterhin sollte die mögliche Beteiligung von Integrinen und / oder MMPs hierbei untersucht werden, sowie mögliche Signaltransduktionswege identifiziert werden. Darüber hinaus sollte die Stimulation der Sekretion von inflammatorischen Zytokine untersucht werden.

Die einzelnen Arbeitsschritte sollten daher umfassen:

1. Untersuchungen der Regulation von IGF-1R und seiner aktivierenden Convertase Furin während der phänotypischen Transformation von humanen monozytären THP-1 Zellen zu THP-1/Makrophagen,
2. Untersuchungen zur Bedeutung der Inhibition der pro-IGF-1R Prozessierung durch Furin bzw. Inhibition mit spezifischen Inhibitoren,
3. Untersuchungen zur Regulation von Integrin $\alpha v \beta 3$ und / oder MMPs und TIMPs in THP-1/Makrophagen durch IGF-1,
4. Untersuchungen zur IGF-1 vermittelten Chemotaxis und Identifikation der beteiligten Zellmembranrezeptoren und / oder Enzymen sowie der verantwortlichen Signaltransduktionswege,
5. Untersuchung zur MIP-1 α und TNF- α Sekretion nach Stimulation von THP-1/Makrophagen mit IGF-1.

3. Material und Methoden

3.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Mikroskop (Immunfluoreszenz)	Olympus BX61, analySIS Software
Mikroskop (Zellkultur)	Axiovert S100, Zeiss
Elektrophoresesystem	Miniprotean 3, Biorad
Heizblock	Roth
Zellkulturschrank	Heraeus Instruments BB6220
Zellkulturbank	Nuaire NU 437-300
pH-Meter	Mettler Delta 320
Autoklavenanlage	H+P Labortechnik Varioclav 135
Filmentwicklungsmaschine	Curix 60, Agfa
ELISA-Reader	MR7000 Dynatech
Scanner	Douscan, Agfa
Zentrifuge (klein)	Biofuge fresco, Heraeus Instruments
Zentrifuge (groß)	Megafuge 1.0, Heraeus Instruments
Schüttler	Promax 1020, Heidolph
Pipetten	Eppendorf
Geltrocknungsrahmen	OLS 2505786
Plastikwaren für die Zellkultur	BD Falcon & Sarstedt
Coverslides	Roth
Objektträger / Chamber slides	Nunc
Eppendorfgefäße	Safe-Lock Tubes
Entwicklungsfilme	BioMax Light Film, Kodak
Nitrocellulosemembranen	Biorad
Filterpapier	Schleicher und Schnell

3.2. Chemikalien und Antikörper

Die ausgeführten Reagenzien und Substanzen wurden von der angegebenen Quelle käuflich bezogen:

Ammoniumsulfat (APS), Glycerol, Glycin, Calciumchlorid, Methanol, Natronlauge, Ethanol von Merck. 2-Mercaptoethanol, Triton X-100, Ponceau-Rot, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Ethylenglycol-bis(beta-aminothethyl)-N,N,N',N' Tetraessigsäure (EGTA), Na-Pyrophosphat, Na_3PO_4 , Wortmannin (Cat.No. 681675), SB203580 (Cat.No. 559389), LY303.511 (Cat.No. 440204), Pyr-RTKR-AMC Furinsubstrat (Cat. No. 344935) von Calbiochem. NVP-AEW541 von Novartis. Insulin-Like Growth Factor-1 (Cat.No. 100-11) von Pepro Tech. LY294.002 (Cat.No. 270-410-M001) von Alexis. MIP-1 α , zyklische Peptide RGD (H-7630), RGE (H-3136), decanoyl-RVKR-Chloromethylketon (dec-CMK; N-1505) von Bachem. Gelatine Type A Porcine Skin (G2625), Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA), Natriumorthovanadat, Bovines Serumalbumin (BSA) 7,5%, Lipopolysaccharid (LPS), Ro32-0432 (R137) von Sigma. RPMI 1640, Penicillin/Streptomycin, Fetales Kälberserum (FKS), Accutase von PAA. L-Glutamin von Biochrom. Proteaseinhibitoren 7x Complete Mini von Boehringer. Natriumorthovanadat Na_3VO_4 , BCA-Assay Kit (23225) von Pierce, Acrylamid von Roth, BSA 7,5%.

Antikörper

Antikörpername	Spezies	Art.Nr.	Firma
Peroxidase-conjugated AffiniPure	Donkey Anti- Rabbit IgG	711-035-152	Jackson Laboratories Inc.
Peroxidase-conjugated AffiniPure	Donkey Anti- Mouse IgG	715-035-150	Jackson Laboratories Inc.
Vimentin	Mouse mAB	1919	Immunotech
Actin (42kDa)	Rabbit pAB	A 2066	Sigma
Furin MON-152	Mouse mAB	ALX-803-017	Alexis
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2, Thr202/Tyr204)	Rabbit mAB	#4370	Cell Signaling
Phospho-Akt (Ser473, 60kDa)	Rabbit pAB	#9271	Cell Signaling
Phospho-PKC α/β II (Thr638/641, 80/82kDa)	Rabbit pAB	#9375	Cell Signaling
Phospho-p38 MAP-Kinase (Thr180/Tyr182, 40kDa)	Rabbit pAB	#9211	Cell Signaling
p38 MAPK (40kDa)	Rabbit pAB	#9212	Cell Signaling
Phospho-Paxillin (Tyr118, 68kDa)	Rabbit pAB	#2541	Cell Signaling
Phospho-Tyr (PY20)	Mouse mAB	sc-508	Santa Cruz Biotech. Inc
IGF-1R β (C20)	Rabbit pAB	sc-713	Santa Cruz Biotech. Inc.
Integrin β 3 (F-11)	Mouse mAB	sc-7311	Santa Cruz Biotech. Inc.
Anti-Integrin α v VNR139 (125kDa)	Mouse mAB	407282	Calbiochem
Anti-FAK (pTyr397, 125kDa)	Rabbit pAB	341292	Calbiochem
Anti-Integrin α v	Rabbit pAB	AB1830	Chemicon
Anti-Integrin α v β 3 LM609	Mouse mAB	AB1976Z	Chemicon
Anti-Insulin/IGF-1 Receptor (IR/IGR1R, pTyr1158)	Rabbit pAB	No.44-802	Biosource
Sekundärantikörper FITC	Rabbit pAB	FI1000	Vector Lab.
Sek.-antikörper Texas Red	Rabbit pAB	TI1000	Vector Lab.

3.3. Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen an einer Nuair Zellkulturbank. Für die Untersuchungen wurde die humane monozytäre THP-1 Zelllinie benutzt, welche von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) gekauft wurde. Die Kultivierung erfolgte in einem Zellkulturinkubator bei 37°C und 95% relativer Luftfeuchtigkeit unter kontrollierter CO₂-Atmosphäre (5%) in RPMI 1640 Nährmedium ergänzt mit 10% fetalem Kälberserum und 2mmol/L L-Glutamin. Um einer möglichen bakteriellen Kontamination vorzubeugen, wurden dem Kulturmedium 100U/mL Penicillin und 100µg/mL Streptomycin zugesetzt. Das Kulturmedium wurde dreimal wöchentlich erneuert und die Zellen nach 15 Passagen verworfen. Die Differenzierung zu Makrophagen konnte nach 48 Stunden durch Zugabe von 50nmol/L Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) erreicht werden [51]. Mikroskopisch konnten die Zellarten unterschieden werden, da THP-1 Zellen in Suspension vorliegen, Makrophagen jedoch adhären sind. Nach der Differenzierung wurden die Zellen mit calcium- und magnesiumhaltigem 1xPBS gewaschen und für 24 Stunden in serumfreiem RPMI 1640 Medium kultiviert, um PMA Effekte auszuschließen und die Zellen zu synchronisieren.

Für „die Experimente“ wurden die adhären Zellen nach Spülen mit calcium- und magnesiumfreiem 1xPBS durch 5-minütige Behandlung mit 2,5mL Accutase bei 37°C abgelöst. Nach mikroskopischer Kontrolle wurde die Reaktion der accutasehaltigen Zellsuspension mit 5mL 10% FKS gestoppt, in einem 15mL Falconröhrchen aufgenommen und 10 Minuten bei 1.300U/min und 4°C zentrifugiert. Die Zellzahl wurde in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurden 10µL Zellsuspension in 190µL Trypan-Blau verdünnt und davon nach 10 Minuten 10µL in die Zählkammer gegeben, vier Gesichtsfelder wurden ausgezählt und der Mittelwert bestimmt. Vitale Zellen nehmen kein Trypan-Blau auf, gefärbte Zellen wurden nicht gezählt. Der Mittelwert multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor 20 und 10⁴ ergab die Zellzahl. Nach Bestimmung der Zellzahl und Verdünnung im Medium konnten die Zellen erneut ausgesetzt werden und adhären nach ca. 30 Minuten.

In pharmakologischen Inhibitionsversuchen wurden die Zellen mit dem spezifischen Furininhibitor dec-CMK (50 μ mol/L) für 12 Stunden oder mit anderen Inhibitoren für 30 Minuten vorinkubiert und dann in Experimenten in Anwesenheit des Inhibitors benutzt.

3.4. Proteinextraktion und Proteinbestimmung

Für die Untersuchung von Zellproteinen in Western Blot-Experimenten wurden die Zellen zunächst lysiert, die Proteine isoliert und deren Konzentration bestimmt.

Dazu wurden die Zellen nach Spülung mit calcium- und magnesiumhaltigem 1xPBS in 1,5 mL 1xPBS mit Zellschabern abgekratzt, die Zelllösung in 2 mL Eppendorf-Pipetten aufgenommen und bei 2.000U/min, 4°C fünf Minuten zentrifugiert. Die Zellyse des Peletts wurde durch 30-minütige Zugabe von Proteinextraktionspuffer auf Eis erreicht. Die Überstände wurden nach 10 Minuten Zentrifugation bei 13.000U/min und 4°C in Eppendorf-Tubes überführt. Um eine gleichmäßige Beladung der Gele zu gewährleisten, wurden die Proteinkonzentrationen mittels BCA Protein Assay Kit bestimmt. Das Prinzip des Kits basiert auf der Biuret Reaktion bei der Cu^{2+} Ionen durch Proteine zu Cu^{1+} reduziert werden. Das entstehende violette Reaktionsprodukt wird photometrisch messbar quantifiziert. Hierzu wird eine Standardkurve mit Hilfe einer BSA Verdünnungsreihe aufsteigender Konzentrationen von 62,5 bis 1000 μ g/mL benutzt, um die Extinktionen der Proben in Konzentrationswerte umrechnen zu können. Die Proben wurden 1:10 auf ein Gesamtvolumen von 50 μ L mit destilliertem Wasser verdünnt und im Doppelansatz je 20 μ L auf eine 96-well Platte aufgetragen. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 300 μ L Arbeitslösung (Assay Reagent A und B im Verhältnis 1:50) pro Well und 30-minütiger Inkubation bei 37°C erzeugt und anschließend kolorimetrisch bei 562nm analysiert.

Zellysepuffer

20mmol/L Tris, pH 7.5, 150mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1mmol/L EGTA, 1% Triton X-100, 2.5mmol/L Natrium Pyrophosphate, 1mmol/L Na₃VO₄ und Protease Inhibitoren (7x Complete Mini).

3.5. SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

Die Proben wurden auf ein Gesamtvolumen von 50µL eingestellt. Dazu wurden sie mit destilliertem Wasser auf eine Menge von 50µg verdünnt und mit 5x Probenpuffer aufgefüllt. Nach 5-minütigem Erhitzen im Heizblock auf 95°C wurden die Proben wieder auf Eis abgekühlt und mittels SDS-Gelelektrophorese im Spannungsfeld (80mV) aufgetrennt. Nach Durchlaufen des Sammelgels wurde die Spannung auf 110mV erhöht bis die Proteine genügend weit im Trenngel aufgetrennt waren. Anschließend erfolgte der Proteintransfer auf die Nitrozellulosemembran. Hierzu wurde das Trenngel vom Sammelgel getrennt und das Trenngel sowie die Bestandteile des Transfersystems (Filterpapier, Schwämmchen, Nitrozellulose) in 4°C kaltem Transferpuffer äquilibriert. Die negativ geladenen Proteine laufen im Tankblot in Richtung der Anode, d.h. die Anordnung wurde so gewählt, dass die Proteine vom Trenngel auf die Nitrozellulosemembran gelangen konnten. Der Transfer erfolgte unter Eiskühlung bei 100mV für eine Stunde auf einem Magnetrührer. Die Nitrozellulosemembran wurde mit Ponceau-Rot gefärbt, um die Qualität des Transfers und der Proteinbeladung zu prüfen und anschließend in 5% Magermilch in TBST-Puffer für eine Stunde inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Danach wurde die Membran kurz mit TBST-Puffer gewaschen und hiernach mit dem Primärantikörper über Nacht auf einem horizontalen Schüttler inkubiert.

Nach dreimaligem viertelstündigen Waschen mit TBST-Lösung wurde der Peroxidase-konjugierte Sekundärantikörper zugegeben und bei Raumtemperatur zwei Stunden inkubiert. Dabei wurde der Sekundärantikörper nach der Spezies des Primärantikörpers (Maus oder Kaninchen) ausgesucht. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit TBST (dreimal 10 Minuten). Zum Entwickeln wurde die Nitrozellulose mit Detektionslösung von Amersham (angesetzt entsprechend

Herstellerempfehlung) inkubiert und in der Dunkelkammer der Röntgenfilm aufgelegt und entwickelt.

Trenngelpuffer (1,5 mol/L pH 8,8)

181,71g Tris Base auf 1L destilliertes H₂O

Sammelgelpuffer (1 mol/L pH 6,8)

121,14g Tris Base auf 1L destilliertes H₂O

Trenngel 8% (2 Gele)

9,3mL destilliertes H₂O + 5,3mL 30% Acrylamid + 5mL Trenngelpuffer + 200µL 10% SDS-Lösung + 12µL TEMED + 200µL 10% APS

Sammelgel 5% (2 Gele)

5,5mL destilliertes H₂O + 1,3mL 30% Acrylamid + 1mL Sammelgelpuffer + 80µL 10% SDS-Lösung + 8µL TEMED + 80µL 10% APS

Transferpuffer (5fach)

144g Glycin + 30,3g Tris Base auf 2L destilliertes H₂O

vor dem Gebrauch

400mL 5fach Puffer + 400mL Methanol auf 2L destilliertes H₂O

Elektrodenpuffer (5fach)

30,2g Tris Base (25 mmol/L) + 188g Glycin (250 mmol/L) + 100 mL 10% SDS auf 2L destilliertes H₂O

Arbeitslösung 1fach

Proteinladepuffer nach Laemmli (5fach)

1mol/L Tris-HCl (pH 6,8) 30mL + SDS 10g + Glycerol 50mL + β-Mercaptoethanol 20mL + Bromphenolblau 250mg

TBS-Puffer (5fach, pH 7,6)

24,2g Tris Base + 80g NaCl auf 2L destilliertes H₂O

nach Verdünnen: 2mL/L 1:2 verdünntes Tween 20 zufügen (=1x TBST)

0,1% Ponceau Lösung

0,5g Ponceau S in 500 ml 5% CH₃COOH

3.6. Gelatinezymographie

Hierzu wurde eine definierte Zellzahl von 4×10^6 Zellen ausgesetzt und diese mit bzw. ohne IGF-1 (50 und 100ng/mL) für 24 Stunden stimuliert. Anschließend wurde 1mL der Überstände bei 2.000U/min für 10 Minuten zentrifugiert, um den Zelldebris zu entfernen. Den Elektrophoresegelen wurde 1,0% Gelatine zugesetzt. Als Positivkontrolle liefen Überstände der HT1080 Zellreihe mit, in denen sich MMP-2 und MMP-9 findet. Die Elektrophorese wurde nach Durchlaufen der Sammelgele von 80mV auf 110mV eingestellt, die Laufzeit betrug dabei ca. 2-3 Stunden. Anschließend wurden die Gele in 2,5%iger Triton-X 100 Lösung erst für 30 Minuten, dann nochmals für 15 Minuten gewaschen, um SDS aus den Gelen zu entfernen.

Da die inaktiven Vorstufen der MMPs keine Enzymaktivität besitzen, man diese jedoch auch detektieren möchte, wurden die Gele mit Developing Puffer, der die Pro-Enzyme chemisch aktiviert und es ihnen ermöglicht die Gelatine zu spalten, über Nacht inkubiert. Abschließend wurden die Gele in Coomassielösung für zwei Stunden bei Raumtemperatur blau angefärbt und in Entfärberlösung für eine Stunde inkubiert, um den Kontrast herauszustellen. Gespaltene Gelatine färbt sich nicht an, sind MMP-Aktivitäten in den Überständen der Zellen vorhanden, hinterlassen diese weiße Aussparungen im blauen Gel. Zur Lagerung wurden die Gele in Rahmen zwischen Klarsichtfolien getrocknet.

Gele 10% 1mm dick (2 Gele)

7mL destilliertes H₂O + 1mL 2% Gelatine (Sigma G2625) + 6,6mL 30% Acrylamid + 5mL Trenngelpuffer + 200 μ L 10% SDS + 8 μ L TEMED + 200 μ L 10% APS

Sammelgele siehe Western Blot (5%)

Ladepuffer Novex Invitrogen LC2676: Tris-Glycine SDS Sample Buffer (2x)
1:2 verdünnen (z.B. 20 μ L Puffer + 20 μ L Überstand)

Developingbuffer (10fach)

12,1g Tris-base + 63,0g Tris-HCl + 117g NaCl + 7,4g CaCl₂ + 0,2% Brij35 auf 1L destilliertes H₂O .

Coomassiefärbung (Brillant Blue G, B-0770, Sigma)

2,5g Coomassie + 150ml Methanol, dann 50ml Essigsäure zugeben

Coomassieentfärber

500mL Methanol + 100mL Essigsäure auf 1L destilliertes H₂O

Einpackpuffer

200mL Ethanol + 100mL Glycerin auf 1L destilliertes H₂O

3.7. Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurden 8-well Kammern über Nacht bei 4°C mit 0,2%iger Gelatine beschichtet, diese anschließend mit 1xPBS gespült und 30.000 THP-1/Makrophagen ausgesetzt. Nach zweistündiger Adhäsion der Zellen wurden sie mit 4% gepuffertem Methanol bei -20°C für 20 Minuten fixiert und anschließend mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit den Primärantikörpern erfolgte über Nacht bei 4°C in 1:100 Verdünnung mit AB-Diluent. Hiernach wurde der Objektträger dreimal je 5 Minuten mit 1xPBS/0.01% Triton-X gewaschen und dann mit Fluorescein Isothiocyanat (FITC)- oder Texas Red-konjugierten Sekundärantikörper für eine Stunde

inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit 1xPBS/0.01% Triton-X wurde das Präparat mit Mountingmedium (Vectorshield) verschlossen. Um die Antikörperspezifität zu kontrollieren, wurde in einer Kammer jeweils der Primärantikörper weggelassen. Die Objektträger wurden mit Hilfe der analySIS Software unter dem Mikroskop ausgewertet.

AB-Diluent

10% Ziegenserum in 1xPBS + 0.3% Triton-X

3.8. Checkerbox und Migrationsassay

Für die Migrationsassays wurden Filter einer Porengröße von 8µm auf einer 24-well Platte über Nacht bei 4°C mit Vitronektin (10µg/mL) beschichtet und anschließend eine Stunde mit 1% bovinem Serumalbumin bei 37°C geblockt. Pro Filter wurden 500.000 Zellen in serumfreiem Medium ausgesetzt. Nach dreistündiger Migrationszeit bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Filter mit kaltem calcium- und magnesiumhaltigen 1xPBS gespült, mit Q-tips innen geputzt und anschließend in 100% Methanol bei -20°C für 30 Minuten fixiert. Zur Auswertung wurden die Filter/Zellen mit filtrierter Hämalaunlösung gefärbt und je drei Gesichtsfelder pro Filter unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Die Experimente wurden stets im Doppelansatz (zwei Filter) durchgeführt und insgesamt mindestens dreimal wiederholt.

3.9. Furin Aktivitätsassay

Für die Bestimmung der Enzymaktivität von Furin wird ein Furinsubstrat (Pyr-RTKR-AMC) benutzt, an welches ein Fluoreszenzfarbstoff (AMC) gebunden ist. Spaltet Furin dieses Substrat, wird der Farbstoff freigesetzt und kann im Spektrometer bei einer Anregung von 320nm und einer Emission von 430nm gemessen werden. Je größer die Aktivität von Furin, desto mehr Substrat wird gespalten und desto mehr Farbstoff wird frei und kann gemessen werden.

Für die Versuche wurden die THP-1 Monozyten bzw. Makrophagen abgelöst, zentrifugiert und zweimal mit 1xPBS gewaschen. Zum Lysieren der Zellen

wurden diese dreimal bei -80°C für einige Minuten eingefroren und bei 37°C aufgetaut und hiernach 15 Sekunden im Ultraschallbad lysiert. Die Zelllysate wurden bei 4°C und 14.000rpm für 30 Sekunden zentrifugiert und das Pellet in 1xPBS gelöst. Das Zelllysats ($10\mu\text{L}$) wurde zusammen mit $5\mu\text{L}$ des Furinsubstrates und $35\mu\text{L}$ Reaktionspuffer inkubiert und kontinuierlich im Fluostar Spektrometer (Anregung 320nm, Emission 430nm) über eine Stunde gemessen. Als Datenpunkt wurden die fluoreszierenden Units an gespaltem Furinsubstrat, welche die Enzymaktivität Furins widerspiegelt, nach 10 Minuten benutzt. Die Furin-Aktivität in THP-1 Monozyten wurde dabei 100% gesetzt und mit der Aktivität der THP-1/Makrophagen verglichen.

Reaktionspuffer

25mmol/L MES Puffer + 25mmol/L Tris-Base + 2,5mmol/L CaCl_2 (ph 7,4)

3.10. MIP-1 α und TNF- α ELISA

Für die Bestimmung der Zytokinsekretion der Zellen wurden das ELISA Single Analyte Assay Kit für TNF- α und MIP-1 α von Biomol benutzt. Dafür wurden die Überstände der unbehandelten bzw. mit IGF-1 (50ng/mL) oder Lipopolysaccharid (LPS, $10\mu\text{g}/\text{mL}$) behandelten Zellen für 10 Minuten bei 1000g und 4°C zentrifugiert und anschließend mit Sample Dilution Puffer 1:1 verdünnt. Mit Hilfe des Standardantigens und des Dilution Puffers wurde eine Standardkonzentrationsreihe von 0 bis $2000\text{pg}/\text{mL}$ hergestellt. $50\mu\text{L}$ je Proben bzw. Standard wurden mit $50\mu\text{L}$ Assay Puffer für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf der ELISA-Platte inkubiert. Danach erfolgte ein dreimaliger Waschschrift mit Hilfe des Waschpuffers. Im Anschluss wurde die Platte mit je $100\mu\text{L}$ Detektionsantikörper (1:20 verdünnt) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und hiernach erfolgte erneut ein dreimaliger Waschschrift mit Waschpuffer. Der Sekundärantikörper Avidin-HRP wurde in einer Verdünnung von 1:1000 für 30 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit zugegeben, bevor erneut dreimal gewaschen wurde. Nach 15-minütiger Inkubation mit Developmentlösung wurde die Reaktion mit Stop-

Solution beendet und bei 450nm im Photometer die Absorbtion bestimmt. Mit Hilfe der Standardreihe ließen sich die Zytokinkonzentrationen in ng/mL bestimmen.

3.11. Datenanalyse

Alle Experimente wurden mindestens in Triplikaten und in mindestens drei verschiedenen Experimenten durchgeführt. Die semiquantitative Densitometrie der Western Blots wurde mit dem National Institute of Health (NIH) Programm ImageJ 1.62 durchgeführt und ist in arbiträren Einheiten (A.U.; arbitrary units) dargestellt. Die Daten sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung (SD) angegeben. Der Vergleich zwischen den Werten/Gruppen wurden mit one-way ANOVA und dem Student t-Test durchgeführt, statistische Signifikanz bestand bei $p < 0.05$. Balkendiagramme wurden mit dem Programm Sigma Plot erstellt.

4. Ergebnisse

4.1. Die Regulation des IGF-1 Rezeptors, α_v Integrin und Furin während der Monozyten → Makrophagendifferenzierung

Zu Untersuchungen der Bedeutung von IGF-1 auf Makrophagenfunktionen wurde die humane monozytäre THP-1 Zelllinie benutzt. Vorteile des Gebrauchs dieser Zelllinie gegenüber humanen Monozyten sind die einfache Kultivierung, die dauerhafte Verfügbarkeit durch rasches Wachstum der Zellen sowie die Reinheit der Kultur. Die Differenzierung zu THP-1/Makrophagen wurde durch Inkubation der monozytären Zellen mit 50nmol/L Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) über 48 Stunden erreicht [51]. Um mögliche Einflüsse von PMA auf den Versuch auszuschließen, wurde nach 48-stündiger Differenzierung PMA entfernt, die Zellen mit 1xPBS gewaschen und dann für weitere 24 Stunden in frischem PMA-freien Wachstumsmedium kultiviert. Studien, die verschiedene monozytäre Zelllinien hinsichtlich ihrer Ähnlichkeit in Funktion und Aktivität gegenüber humanen Makrophagen verglichen, zeigten, dass sich THP-1/Makrophagen jenen am ähnlichsten verhalten [52]. Zusätzlich ist die Variabilität in den Experimenten sehr gering, da diese Differenzierung - anders als bei Nativmonozyten - einfach und stabil verläuft. THP-1 Monozyten liegen in Suspension vor, während THP-1/Makrophagen an den Zellkulturschalen adhären, sie weisen einen ausgeprägten Golgi-Apparat, ein raues endoplasmatisches Retikulum sowie freie Ribosomen und Mikrovilli auf [52].

Der Differenzierungsprozess von THP-1 Monozyten zu Makrophagen wurde daher im Phasenkontrastmikroskop durch ihre typische Zellmorphologie sowie mittels Western Blot durch die Expression des Makrophagenmarkerproteins Vimentin überwacht (Abbildung 2 A und C). Während sich in THP-1 Monozyten kein Vimentin findet, ist dieses in THP-1/Makrophagen stark exprimiert. Die Regulation des IGF-1 Rezeptors, seiner aktivierenden Convertase Furin und α_v Integrin während der Monozyten → Makrophagendifferenzierung wurde in Western Blots sowie mittels Bestimmung der enzymatischen Aktivität untersucht. Abbildung 2B zeigt, dass

es während der Differenzierung zu Makrophagen zu einem 2,5fachen Anstieg der Enzymaktivität Furins kommt. Western Blot Untersuchungen zeigten darüber hinaus, dass die Differenzierung zu THP-1/Makrophagen von einem Anstieg der IGF-1 Rezeptorexpression und von einer α_v Integrininduktion begleitet ist (Abb. 2C).

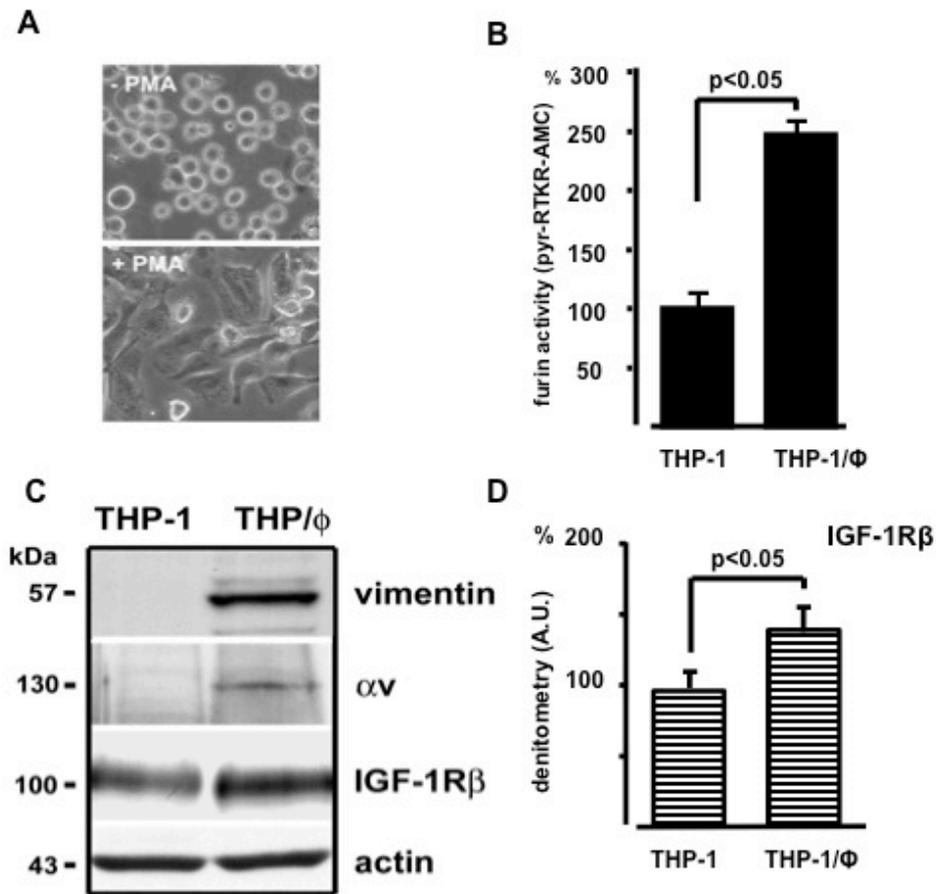


Abbildung 2. Die Differenzierung von THP-1 Monozyten zu THP-1/Makrophagen wurde mit Hilfe von 50 nmol/L PMA Stimulation für 48 Stunden erreicht. **(A)** zeigt die typische Zellmorphologie im Phasenkontrastmikroskop, während die runden THP-1 Monozyten (-PMA) in Suspension vorliegen, adhären die THP-1/Makrophagen (+PMA). **(B)** THP-1/Makrophagen sind durch einen 2,5fachen Anstieg der Enzymaktivität von Furin gekennzeichnet. **(C)** zeigt exemplarisch die Induktion von Vimentin und α_V Integrin sowie die Expressionssteigerung des IGF-1 Rezeptors während der Differenzierung zu THP-1/Makrophagen (THP/φ). **(D)** Densitometrie des Western Blot für IGF-1R β aus (C). n=3

4.2 Die IGF-1 induzierte Migration von THP-1/Makrophagen wird durch Integrine vermittelt

Eine wichtige Funktion von Chemokinen und Wachstumsfaktoren ist deren chemotaktische Wirkung auf Entzündungszellen.

Wir untersuchten daher zunächst die mögliche chemotaktische Wirkung von IGF-1 auf THP-1/Makrophagen in „Checkerbox-Experimenten“. Dazu wurden THP-1 Monozyten mittels 48-stündiger PMA-Behandlung (50 nmol/L) zu THP-1/Makrophagen differenziert, diese 24 Stunden serumfrei synchronisiert und anschließend 500.000 Zellen auf Vitronectin-beschichtete Filter (10µg/mL) einer Porengröße von 8µm ausgesetzt. Die eingehangenen Filter bilden auf einer 24-well Platte ein Zweikammersystem, in welchem sich die Zellen in der oberen Kammer befinden und für drei Stunden in die freie untere Kammer migrieren sollen.

Die Herstellung eines Konzentrationsgradienten von IGF-1 (50ng/mL, untere Kammer) ermöglicht die Untersuchung der chemotaktischen Wirkung auf die THP-1/Makrophagen, während die direkte Stimulation der Zellen mit IGF-1 (50ng/mL, obere Kammer) die ungerichtete chemokinetische Zellbewegung testet. Als Kontrolle wurde einerseits serumfreies Medium in beiden Kammern verwendet, andererseits die IGF-1 (50ng/mL) Zugabe in beiden Kammern getestet. Am Ende der Migrationsdauer wurden die Zellen, welche auf die Unterseite des Filters migriert sind, mit filtrierter Hämalaunlösung angefärbt und lichtmikroskopisch in je drei Gesichtsfeldern pro Filter gezählt.

Die Ergebnisse zeigen (Tabelle 1), dass durch Erzeugen eines chemotaktischen Gradienten (IGF-1 50ng/mL nur in der unteren Kammer) eine signifikante Migration (ca. zweifach gesteigert) von THP-1/Makrophagen induziert wird. Weder die direkte Stimulation mit IGF-1 (obere Kammer) noch das Vorhandensein von IGF-1 in beiden Kammern hatte einen Einfluss auf die Migration der Zellen.

IGF-1 wirkt chemotaktisch auf THP-1/Makrophagen

	Obere Kammer	Untere Kammer	Zellen/HPF
	-	-	24 ± 4
	-	IGF-1	56 ± 10*
	IGF-1	-	21 ± 6
	IGF-1	IGF-1	25 ± 8

Tabelle 1: Gezeigt wird die Steigerung der Migration durch IGF-1 (50ng/mL) in Checkerbox-Experimenten durch einen Konzentrationsgradienten (IGF-1 in der unteren Kammer). Zellen sind im oberen Kompartiment ausgesetzt, IGF-1 (50ng/mL) wurde in keine (unstimulierte Kontrolle), die untere, die obere oder in beide Kammern gegeben. Dauer der Migration drei Stunden. (Mittelwert +/- SD, * p<0.05 vs. unstimulierte Kontrolle, n=3 unabhängige Experimente)

Somit zeigen diese Versuche, dass IGF-1 chemotaktisch auf THP-1/Makrophagen wirkt.

Da Zellmotilität entscheidend von Integrinen und / oder MMPs gesteuert wird, wurde in weiteren Versuchen deren Bedeutung für die IGF-1 induzierte Migration von THP-1/Makrophagen detaillierter untersucht.

Hierzu wurden mit PMA (50nmol/L, 48 Stunden) differenzierte THP-1/Makrophagen nach Synchronisation in serumfreiem Medium auf Vitronektin-coatede Filter (10 μ g/mL) ausgesetzt und ein IGF-1 Konzentrationsgradient hergestellt (IGF-1 untere Kammer, 50ng/mL). Nach dreistündiger Migration steigerte IGF-1 (50ng/mL) signifikant die Migration von THP-1/Makrophagen (Abb. 3; * $p < 0.05$ vs. unbehandelte Kontrollen). Zur Untersuchung der Bedeutung von $\alpha v \beta 3$ -Integrinen wurde deren Ligandenbindung durch Vorinkubation mit zyklischen Integrin-blockierenden Sequenzpeptiden (RGD-Peptide, *Arg-Gly-Asp*) und Integrin-blockierende Antikörpern ($\alpha v \beta 3$ -Integrin blockierender Antikörper LM609 und $\beta 3$ -Integrin blockierender Antikörper F11) gehemmt. Die Aktivität von MMPs wurden mit dem spezifischen pharmakologischen Hydroxymat Breitspektrum MMP Inhibitor GM6001 gehemmt.

Sowohl die Vorinkubation mit zyklischen Integrin-blockierenden RGD-Peptiden (100nmol/L), als auch von $\alpha v \beta 3$ -Integrin blockierenden Antikörper LM609 (25 μ g/mL) oder Integrin $\beta 3$ blockierenden Antikörper F11 (25 μ g/mL) hemmte die IGF-1 vermittelte Migration von THP-1/Makrophagen signifikant ($\#p < 0.05$ vs. IGF-1). Im Gegensatz dazu zeigte der Breitspektrum MMP-Inhibitor GM6001 (25 μ g/mL) keinen Einfluss auf die IGF-1 vermittelte Makrophagenchemotaxis. Ebenso konnten Kontroll-RGE-Peptide (*Arg-Gly-Glu* 100nmol/L) als auch nicht-immune IgGs (25 μ g/mL) die IGF-1 induzierte Migration nicht hemmen.

Dies weist darauf hin, dass $\alpha v \beta 3$ Integrin ein wichtiger Mediator der IGF-1 vermittelten Migration in THP-1/Makrophagen ist, wohingegen MMPs nicht essentiell erscheinen.

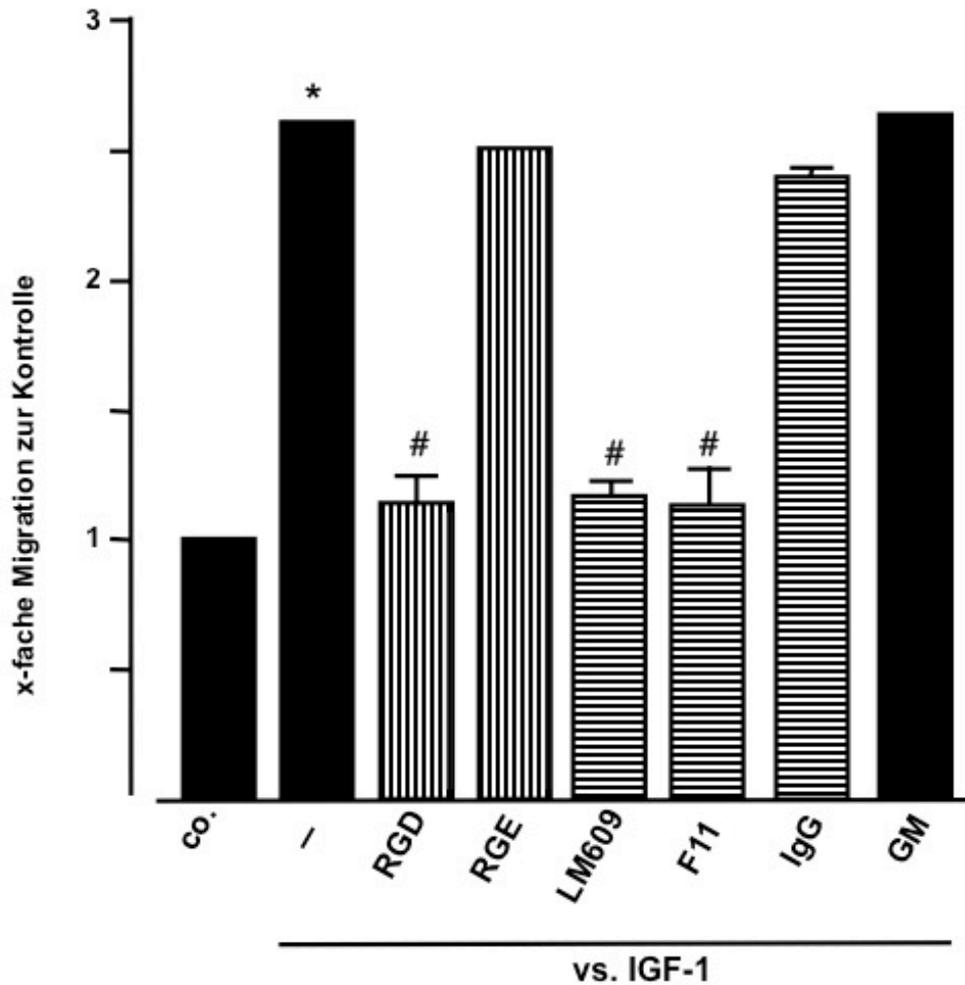


Abbildung 3. Einfluss von Integrinen und MMPs auf die IGF-1 induzierte Migration von THP-1/Makrophagen. Die IGF-1 induzierte Migration von THP-1/Makrophagen durch Vitronektin-beschichtete Filter (10 μ g/mL) wurde durch zyklische RGD Peptide (100nmol/L), den α v β 3-blockierenden Antikörper LM609 (25 μ g/mL) oder durch den Integrin β 3-blockierenden Antikörper F11 (25 μ g/mL) signifikant gehemmt. Die Kontrollpeptide RGE (100nmol/L), nicht-immune Immunglobuline (IgG, 25 μ g/mL) und auch der MMP-Inhibitor GM6001 (GM, 25 μ g/mL) hatten keinen Einfluss auf die IGF-1 vermittelte Migration. (*p<0.05 vs. Kontrolle (co.), #p<0.05 vs. IGF-1) n=3

4.3. Expression und Regulation von Integrinen und Matrix Metalloproteinasen und TIMPs in THP-1/Makrophagen

Um die Regulation von Integrinen und / oder MMPs während der IGF-1 vermittelten Migration von THP-1/Makrophagen weiter zu differenzieren, wurden Western Blot Experimente, Gelatinezymographien sowie Immunfluoreszenzfärbungen mit PMA-differenzierten (50nmol/L, 48 Stunden) THP-1/Makrophagen durchgeführt. THP-1/Makrophagen sowie humane native Makrophagen besitzen typischerweise signifikante Mengen von $\alpha v \beta 3$ Integrin sowie MMP-9 und membrangebundenes MT1-MMP, exprimieren jedoch nur gering MMP-2 [28; 39].

Western Blot Experimente zeigen, dass die 24-stündige Stimulation der THP-1/Makrophagen mit IGF-1 (50ng/mL) keinen Einfluss auf die Expression und Aktivierung von MMP-9 und MT1-MMP hat, auch das Gesamtprotein ihrer physiologischen Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 in THP-1/Makrophagen blieb unbeeinflusst (Abb. 4A). In Gelatinasezymographien hatte weder eine Stimulation der Zellen mit 50ng/mL noch mit einer Konzentration von 100ng/mL IGF-1 (24 Stunden) einen Einfluss auf den Aktivierungsstatus von MMP-2, oder -9 (Abb. 4B). Da die Proprotein Convertase Furin sowohl für die endoproteolytische Aktivierung des Pro-IGF-1R (siehe unten), als auch für die von αv verantwortlich ist [28; 39], wurde auch deren Expression nach IGF-1 Stimulation in Western Blot Experimenten untersucht. IGR-1 (50ng/mL, 24 Stunden) hat weder auf die Menge an Gesamtprotein von Furin noch auf αv -Integrin Einfluss (Abb. 4C).

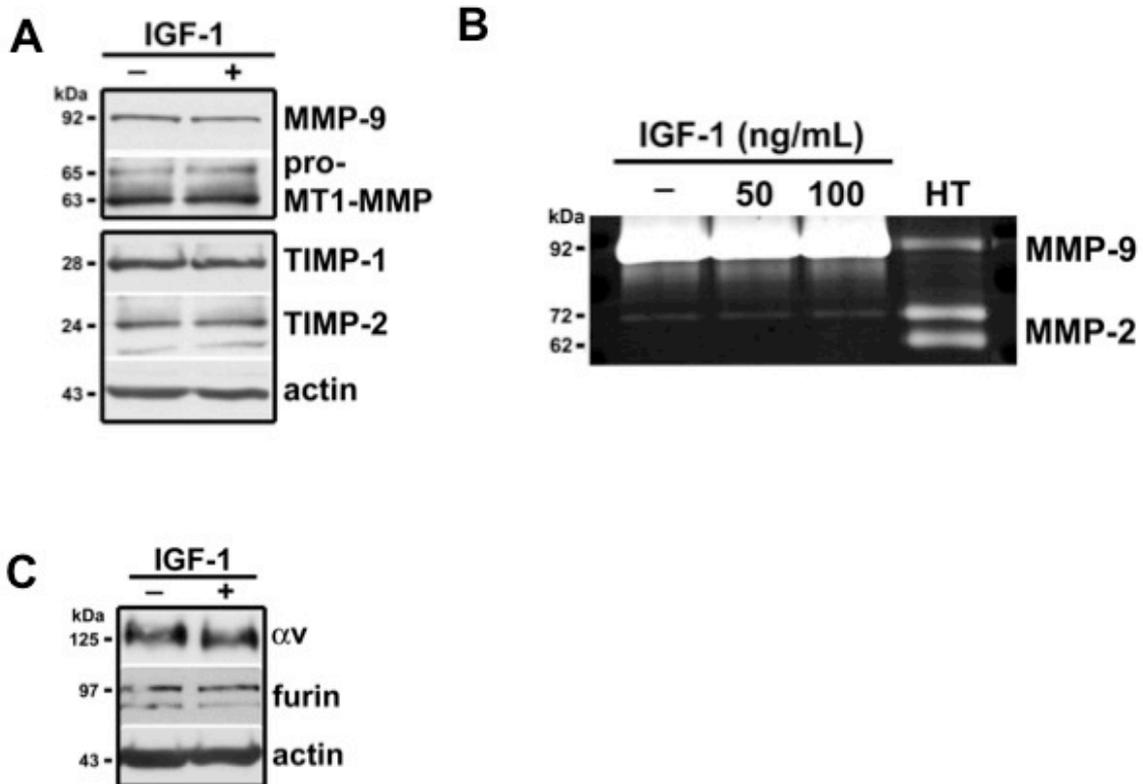


Abbildung 4. Exemplarische Darstellung von Western Blot- und Zymographieexperimente zur Regulation von Integrinen, MMPs und Furin nach IGF-1 Stimulatin. **(A)** Stimulation der THP-1/Makrophagen mit IGF-1 (50ng/mL, 24h) beeinflusst weder das Gesamtprotein von MMP-9 und MT1-MMP noch die physiologischen MMP-Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2. **(B)** Gelatinezymographien zeigen, dass IGF-1 (50 oder 100ng/mL; 24h) die Aktivität von MMP-9 und MMP-2 nicht beeinflusst (Überstände von HT1080 Zellen wurden als Standard benutzt = HT). **(C)** IGF-1 beeinflusst weder das Gesamtprotein von α v Integrin noch das von Furin. n=3

In weiteren Experimenten wurde daher die Wirkung der IGF-1 Stimulation auf das *spreading* (Zellmorphologie) und die Anordnung des Zytoskeletts sowie die damit einhergehende Neuordnung der Integrinexpression und die Phosphorylierung Integrin-assoziiierter Adapterproteine untersucht.

Hierzu wurden THP-1 Monozyten mittels PMA (50nmol/L, 48 Stunden) zu THP-1/Makrophagen differenziert und diese auf 8-well Vitronektin-beschichteten (10µg/mL) Kammern ausgesetzt und mit IGF-1 (50ng/mL, 30 Minuten) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe spezifischer gegen $\alpha v \beta 3$ -Integrin, Phospho-Paxillin und Vimentin gerichteter Antikörper immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht.

In Folge der Behandlung mit IGF-1 zeigte sich in der Immunfluoreszenzfärbung ein vermehrtes *spreading* der Zellen mit Neuordnung von $\alpha v \beta 3$ Integrin zu *focal adhesion sites* (fokale Adhäsionsregionen) an Lamellipoden. Diese Änderung der Zellmorphologie und Neuordnung von $\alpha v \beta 3$ Integrin ist begleitet von einer Phosphorylierung des Integrinadapterproteins Paxillin (Tyr¹¹⁸) an den *focal adhesion sites* (Abb. 5).

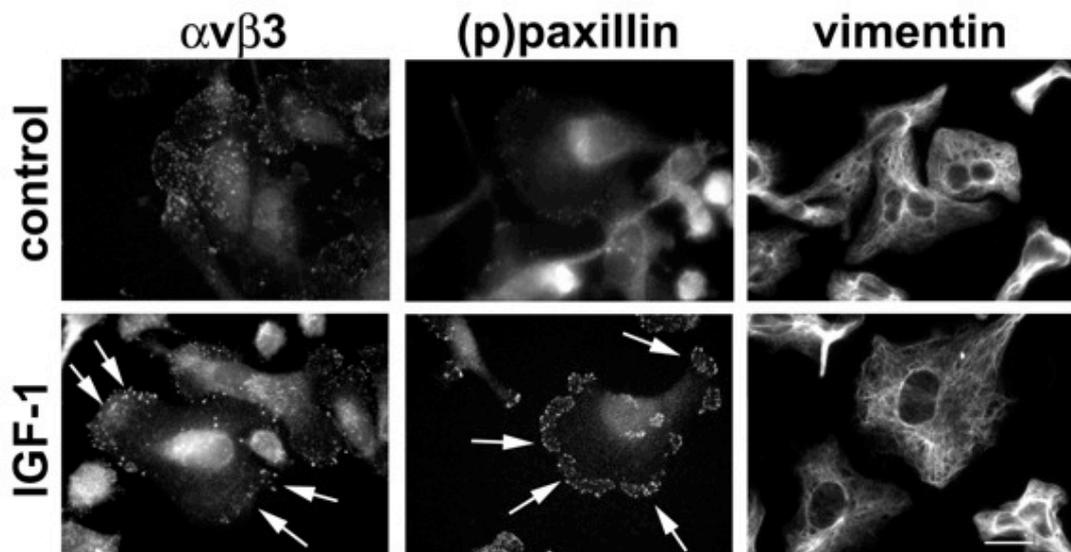


Abbildung 5. Immunfluoreszenzfärbungen zeigen, dass IGF-1 (50ng/mL) vermehrtes Zellspreading sowie eine Umordnung von $\alpha v \beta 3$ Integrin zu fokalen Adhäsionskomplexen initiiert (obere Reihe links zeigt die Verteilung von $\alpha v \beta 3$ Integrin unstimulierter Makrophagen, untere Reihe links zeigt die Umordnung zu fokalen Adhäsionen (Pfeile)). Begleitend findet sich eine gesteigerte Phosphorylierung des Adapterproteins Paxillin an den *focal adhesion sites* (Pfeile mittleres Bild untere Reihe, mittleres Bild obere Reihe zeigt unstimulierte Makrophagen, bei denen es nicht zur Phosphorylierung von Paxillin kommt) In der rechten Abbildung ist die Expression von Vimentin vor (oben) und nach (unten) IGF-1 Stimulation (50ng/mL) dargestellt. Messbalken=50 μ m. n=3

4.4 Bedeutung von Furin auf die Aktivierung des IGF-1 Rezeptors

Um die Bedeutung des IGF-1R und davon abhängiger Signaltransduktionswege bei der IGF-1 abhängigen Integrinaktivierung sowie bei der gesteigerten Migration von THP-1/Makrophagen weiter zu untersuchen, analysierten wir zunächst die Funktion der Pro-IGF-1R Spaltung durch Furin Convertase. Der IGF-1R ist ein heterotetrameres Protein, bestehend aus zwei α und zwei β Untereinheiten. Die Proprotein Convertase Furin, welche sich vornehmlich am *trans*-Golgi Netzwerk (TGN) befindet, ist an der posttranslationalen Modifizierung dieses Rezeptors beteiligt. Sie spaltet dessen Pro-Form an der dibasischen Aminosäuresequenz $RKRR^{740}$ (Arg-Lys-Arg-Arg) endoproteolytisch. Dieser Prozess mündet in der Generierung zweier α und β Rezeptoruntereinheiten, die durch Disulfidbrücken verbunden sind und zur Zellmembran transloziert werden [53; 54]. Somit hemmt die Inhibition der IGF-1R Prozessierung durch Inhibition von Furin die Aktivierung des IGF-1R. Um diesen Prozess zu untersuchen, wurden THP-1/Makrophagen mit dem spezifischen Furin Convertaseinhibitor decanoyl-RVKR-chloromethylketone (dec-CMK, 50 μ mol/L, 12 Stunden) [55] vorinkubiert und die Proteine hiernach mittels Western Blot auf Spaltung/Aktivierung des IGF-1R mit einem gegen die β -Untereinheit des IGF-1R gerichteten Antikörpers untersucht. Auf reduzierenden SDS-Gelen, d.h. mit Zugabe von β -Mercaptoethanol, sind die Disulfidbrücken, welche α - und β -Untereinheiten des IGF-1R verbinden, getrennt. Somit dürfte ein gegen die β -Untereinheit des IGF-1R gerichteter Antikörper auch nur diese erkennen, wohingegen die Inhibition von Furin und damit Inhibition der Pro-IGF-1R Prozessierung die hochmolekulare Pro-Form des Rezeptors durch den gegen die β -Untereinheit gerichteten Antikörper detektiert.

Wir konnten zeigen, dass Furininhibition durch dec-CMK zu einer signifikanten Inhibition der pro-IGF-1R Aktivierung führt. Diese Inhibition ging mit einer Zunahme der Proform des IGF-1R und einer Abnahme der prozessierten β -Untereinheit einher. Die frühe Proform des *endoplasmatischen Retikulum* (ER) blieb unbeeinflusst (Abb. 6 A). Dies zeigt,

dass die posttranslationale Modifikation des Pro-IGF-1R in THP-1/Makrophagen im *trans*-Golgi Netzwerk stattfindet und von Furin abhängig ist.

Der IGF-1R ist bei Aktivierung - ähnlich dem Insulinrezeptor - durch eine Autophosphorylierung von Tyrosin gekennzeichnet. Um die IGF-1R Aktivierung also auf weiterem Wege zu untersuchen, wurde ein spezifischer IGF-1R Tyrosinkinaseinhibitor (NVP-AEW541) verwendet. Im Gegensatz zur Furininhibition mit dec-CMK, beeinflusste der Rezeptor Tyrosinkinaseinhibitor NVP-AEW541 weder den Status der Pro-IGF-1R Aktivierung noch die Proteinmenge seiner resultierenden β -Untereinheit (Abb. 6 A und B). Jedoch zeigen wir, dass sowohl die Inhibition der Pro-Rezeptoraktivierung durch Furinhemmung, als auch die Hemmung der Tyrosinkinase-Aktivität durch NVP-AEW541 zu einer signifikanten Minderung der Phosphorylierung der β -Untereinheit des IGF-1R an Tyrosin führt. Dazu wurden die IGF-1R β Blots mit einem Phospho-Tyrosin Antikörper erneut geblottet, bei Rezeptoraktivierung kommt es zur Phosphorylierung von Tyrosin auf gleicher Bandenhöhe. Beide Mechanismen der IGF-1R Aktivierung führen zu einer Inhibition des IGF-1R-abhängigen *signaling* und eignen sich damit zur weiteren Untersuchung IGF-1/IGF-1R vermittelter Zellfunktionen (Abb. 6B).

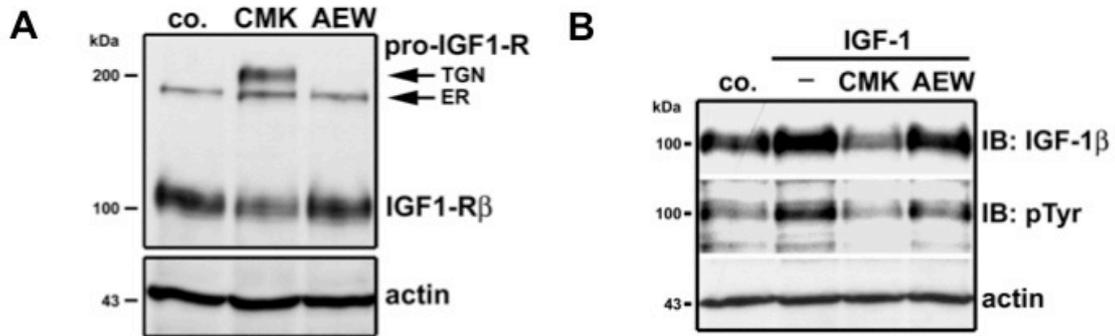


Abbildung 6. Exemplarische Western Blots zeigen den Einfluss der Hemmung von Furin und Hemmung der Rezeptortyrosinkinase auf die IGF-1R Aktivierung. **(A)** THP-1/Makrophagen wurden mit dem Furininhibitor dec-CMK (CMK; 50 μ mol/L; 12h) bzw. dem IGF-1R Tyrosinkinaseinhibitor NVP-AEW541 (AEW; 10 μ mol/L; 30min) inkubiert und die Proteine mit einem Antikörper gegen den IGF-1R (C-terminal, β -Untereinheit) geblottet. Furininhibition verhindert die Generierung der IGF-1R β -Untereinheit, einhergehend mit einem Anstieg seiner *trans*-Golgi Netzwerk Pro-Form (TGN) auf reduzierenden SDS-Gelen (ER=endoplasmatisches Retikulum). **(B)** THP-1/Makrophagen wurden mit dec-CMK (CMK, 50 μ mol/L; 12h) oder NVP-AEW541 (AEW, 10 μ mol/L, 30min) vorinkubiert, die Zellen wurden dann mit IGF-1 (50ng/mL; 30min) stimuliert. Dec-CMK verhinderte die IGF-1 Rezeptoraktivierung, wodurch es zu einer Minderung der aktiven IGF-1R β -Untereinheit kommt, welche von einer signifikant geminderten IGF-1R Tyrosinphosphorylierung begleitet ist. Der IGF-1R spezifische Tyrosinaseinhibitor NVP-AEW541 beeinflusste das Pro-Rezeptorprocessing nicht, hemmte jedoch auch signifikant die Tyrosinphosphorylierung des IGF-1R. n=3

4.5 IGF-1 Rezeptorsignaling aktiviert PI-3 Kinase, PKC- und p38 MAP-Kinase Signaltransduktionswege

Essentielle Zellfunktionen wie Differenzierung, Wachstum und Apoptose sowie Motilität und Sekretion von Zytokinen sind von Änderungen im Phosphorylierungsstatus intrazellulärer *second-messenger* Proteine und konsekutiver Signalmoleküle gekennzeichnet. Zu den wichtigsten dieser Signaltransduktionswege zählen in Makrophagen die *Phosphatidylinositol-3 Kinase* (PI-3 Kinase), *Proteinkinase C* (PKC) und die Gruppe der *Mitogen-aktivierten Proteinkinasen* (MAP-Kinasen).

Um die Signaltransduktionswege, die sich an die IGF-1R Aktivierung anschließen, zu identifizieren, wurden pharmakologische Inhibitoren sowie phosphospezifische Antikörper dieser Signalkaskaden benutzt.

Dazu wurden THP-1 Monozyten mit PMA (50nmol/L, 48 Stunden) zu THP-1/Makrophagen differenziert und mit serumfreiem Medium für 24 Stunden synchronisiert. Anschließend wurden die Zellen mit pharmakologischen Inhibitoren des IGF-1 Rezeptors bzw. der Transduktionswege für 30 Minuten vorinkubiert und danach mit IGF-1 (50ng/mL) für 10 Minuten stimuliert. Die Proteine wurden hiernach mittels Western Blot untersucht.

Die Stimulation von THP-1/Makrophagen mit IGF-1 (50ng/mL, 10min) induziert eine starke Phosphorylierung des Phosphatidylinositol-3 Kinase Proteins Akt (Ser⁴⁷³) sowie der Proteinkinase C (PKC α/β II an Thr^{638/641}) und der p38 MAP-Kinase (Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²). Andere Mitogen-aktivierte Proteinkinasen wie MEK/ERK wurden nur schwach aktiviert (Abb. 7A, B und Daten nicht gezeigt).

Die Inhibition der IGF-1R Aktivierung durch Furininhibition mittels dec-CMK bzw. Tyrosinkinaseinhibition durch NVP-AEW541 konnte die IGF-1 induzierte Akt Phosphorylierung deutlich reduzieren. Die Inhibition der Phosphorylierung und damit der Aktivierung des *PI-3 Kinase* Signalwegs war vergleichbar mit der Hemmung der *PI-3 Kinase* durch den spezifischen Inhibitor Wortmannin (30 Minuten, 50nmol/L) (Abb. 7A).

Die Phosphorylierung von PKC α/β II und p38 MAP-Kinase konnte durch Vorinkubation mit Wortmannin oder dem spezifischen PKC-Inhibitor Ro32-

0421 (30 Minuten, 5 μ mol/L) gehemmt werden, unbeeinflusst blieb die Phosphorylierung von PKC jedoch durch Vorinkubation mit dem p38 MAP-Kinaseinhibitor SB203580 (30 Minuten, 10 μ mol/L), welcher nur die p38 MAP-Kinaseaktivierung hemmte (Abb. 7B und C).

Diese Daten zeigen, dass eine Phosphorylierung der *Proteinkinase C* und *p38 MAP-Kinase* aus einer Aktivierung der *Phosphatidylinositol-3 Kinase* resultiert. Weiterhin lässt sich ableiten, dass sich die *p38 MAP-Kinase* in der IGF-1/IGF-1R abhängigen Signalkaskade unterhalb ("*downstream*") von *PI-3 Kinase* und *PKC* befindet.

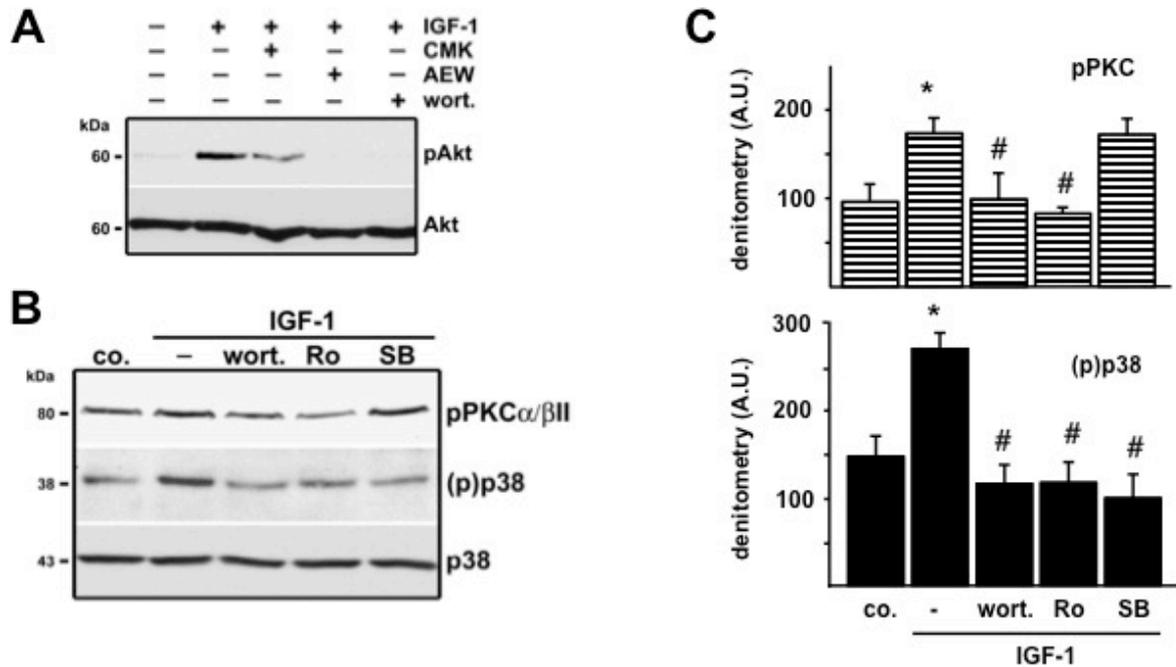


Abbildung 7. IGF-1 Stimulation aktiviert *Akt*, *Proteinkinase C* und *p38 MAP-Kinase*. THP-1/Makrophagen wurden vorinkubiert mit spezifischen pharmakologischen Inhibitoren für Furin (dec-CMK (CMK) 50 μ mol/L, 12h), IGF-1R Tyrosinkinase (NVP-AEW541 (AEW) 10 μ mol/L, 30min), *PI-3 Kinase* (Wortmannin (wort.) 50nmol/L, 30min) und dann mit IGF-1 (50ng/mL, 30min) stimuliert. **(A)** zeigt repräsentative Western Blots mit spezifischen Antikörpern gegen Phospho-Akt und Gesamt-Akt. **(B)** Makrophagen wurden vorbehandelt mit dem *PI-3 Kinase* Inhibitor Wortmannin (wort.; 50nmol/L, 30min), dem *PKC*-Inhibitor Ro32.0432 (Ro; 5 μ mol/L, 30min) bzw. dem *p38 MAP-Kinase*inhibitor SB203580 (SB; 10 μ mol/L, 30min) und danach mit IGF-1 (50ng/mL) stimuliert und geblottet wie abgebildet. **(C)** zeigt die semiquantitativen Densitometrien der Proteinkonzentrationen von Phospho-*PKC α/β II* und Phospho-*p38 MAP-Kinase* aus (B). (* $p < 0.05$ vs. co, # $p < 0.05$ vs. IGF-1). n=3

4.6 IGF-1 induziert die Migration von THP-1/Makrophagen durch Integrin inside-out Aktivierung

Unsere vorhergehenden Untersuchungen zeigten, dass die Stimulation der THP-1/Makrophagen mit IGF-1 (50ng/mL) durch die Aktivierung des IGF-1R zu einer Aktivierung von *PI-3 Kinase*, *Proteinkinase C* und *p38 MAP-Kinase* Signaltransduktionswegen führt.

In Migrationsassays sollte daher untersucht werden, ob dieses *signaling* auch an der IGF-1 induzierten integrinabhängigen Migration von THP-1/Makrophagen beteiligt ist. Hierzu wurden erneut die Migration von THP-1/Makrophagen nach Inhibition der IGF-1R abhängigen Signaltransduktionswege durch spezifische Inhibitoren für die IGF-1R Tyrosinkinase und spezifische Inhibitoren der *PI-3 Kinase* auf Vitronektin-gecoateten (10µg/mL) Filtern untersucht.

Dazu wurden mit PMA (50nmol/L, 48 Stunden) differenzierte THP-1/Makrophagen mit dem spezifischen IGF-1R Tyrosinkinaseinhibitor NVP-AEW541 (10µmol/L, 30 Minuten) sowie dann mit pharmakologischen Inhibitoren der PI-3 Kinase LY294.002 (10µmol/L, 30 Minuten) bzw. seiner Kontrolle LY303.511 (10µmol/L, 30 Minuten) vorinkubiert und die Zellen danach drei Stunden einem IGF-1 (50ng/mL) Konzentrationsgradienten ausgesetzt. LY303.511 hat ähnliche chemische Eigenschaften wie der PI-3 Kinase Inhibitor LY294.002, besitzt jedoch keinerlei Hemmfunktion der PI-3 Kinase Signalwege, es dient als Kontrolle für die Spezifität von LY294.002.

Diese Experimente zeigten, dass die Inhibition der IGF-1R Tyrosinphosphorylierung durch NVP-AEW541 sowie die Blockade der sich anschließenden Signaltransduktionswege durch den PI-3 Kinase Inhibitor LY294.002 zu einer Hemmung der IGF-induzierten Migration führten (Abb. 8A). Die Kontrollsubstanz LY303.511 hatte keinen Einfluss auf die IGF-1 induzierte Migration von THP-1/Makrophagen. Furin-Inhibition wurde bewusst nicht untersucht, da Furin ebenso die α_v Integrin Untereinheit aktiviert [38] und so die Differenzierung zwischen IGF-1R oder α_v -vermittelten Effekten nicht möglich gewesen wäre.

Unsere bisherigen Untersuchungen zeigten, dass die Stimulation der THP-1/Makrophagen mit IGF-1 zu einer Aktivierung von *PI-3 Kinase/PKC/p38 MAP-Kinase* Signalwegen führt. Dabei kommt es infolge IGF-1 Stimulation zu keiner Änderung im Gesamtprotein von α_v , jedoch führt die IGF-1 Stimulation zur Neuordnung von $\alpha_v\beta_3$ Integrin zu fokalen Adhäsionskomplexen und zur Phosphorylierung des Adapterproteins Paxillin.

In Western Blot Analysen untersuchten wir weiterhin, ob die IGF-1/IGF-1R Aktivierung und sein konsekutives *signaling* zu einer *inside-out* Aktivierung von α_v Integrin führt und die Migration von THP-1/Makrophagen initiiert wird. Hierzu wurde die IGF-1R Aktivierung mittels Hemmung der Tyrosinphosphorylierung durch NVP-AEW541 (10 μ mol/L, 30 Minuten) oder das sich anschließende *signaling* durch den p38 MAP-Kinaseinhibitor SB203580 (10 μ mol/L, 30 Minuten) geblockt. Die Zellen wurden dann mit IGF-1 (50ng/mL, 10min) stimuliert. Anschließend wurden im Western Blot die Aktivierung von α_v Integrin mittels phosphospezifischer Antikörper gegen die Integrinadapterproteine FAK und Paxillin untersucht. Die Blots zeigen, dass beide Inhibitoren die IGF-1 vermittelte Phosphorylierung der Integrinadapterproteine FAK (Tyr³⁹⁷) und Paxillin (Tyr¹¹⁸) signifikant hemmen (Abb. 8A). Dies macht die Verknüpfung von IGF-1R Aktivierung und seiner Signaltransduktionswege mit der Aktivierung von Integrin-gekoppelten Adapterproteinen, die für die Ausbildung von fokalen Adhäsionsregion (*focal adhesion sites*) mitverantwortlich sind, deutlich.

Um weiterhin zu untersuchen, ob *inside-out* abhängiges Integrin *signaling* zur Phosphorylierung von Paxillin führt, wurden THP-1/Makrophagen auf Vitronektin (10 μ g/mL) gecoateten Zellkulturschale ausgesetzt und die Zellen dann mit dem $\alpha_v\beta_3$ blockierendem Antikörper LM609 (25 μ g/mL, 30 Minuten) inkubiert und anschließend mit IGF-1 (50ng/mL, 10min) stimuliert.

Da eine Integrinaktivierung über Vitronektin verhindert wird, weil die Bindungsstellen von $\alpha_v\beta_3$ Integrin durch den $\alpha_v\beta_3$ blockierenden Antikörper LM609 besetzt sind, hemmt man die Phosphorylierung der Adapterproteinen und somit die Integrinaktivierung durch *outside-in signaling*. Die bleibende Phosphorylierung von Paxillin ist Ausdruck einer IGF-1 vermittelten *inside-out* Aktivierung von $\alpha_v\beta_3$ Integrin (Abb. 8C).

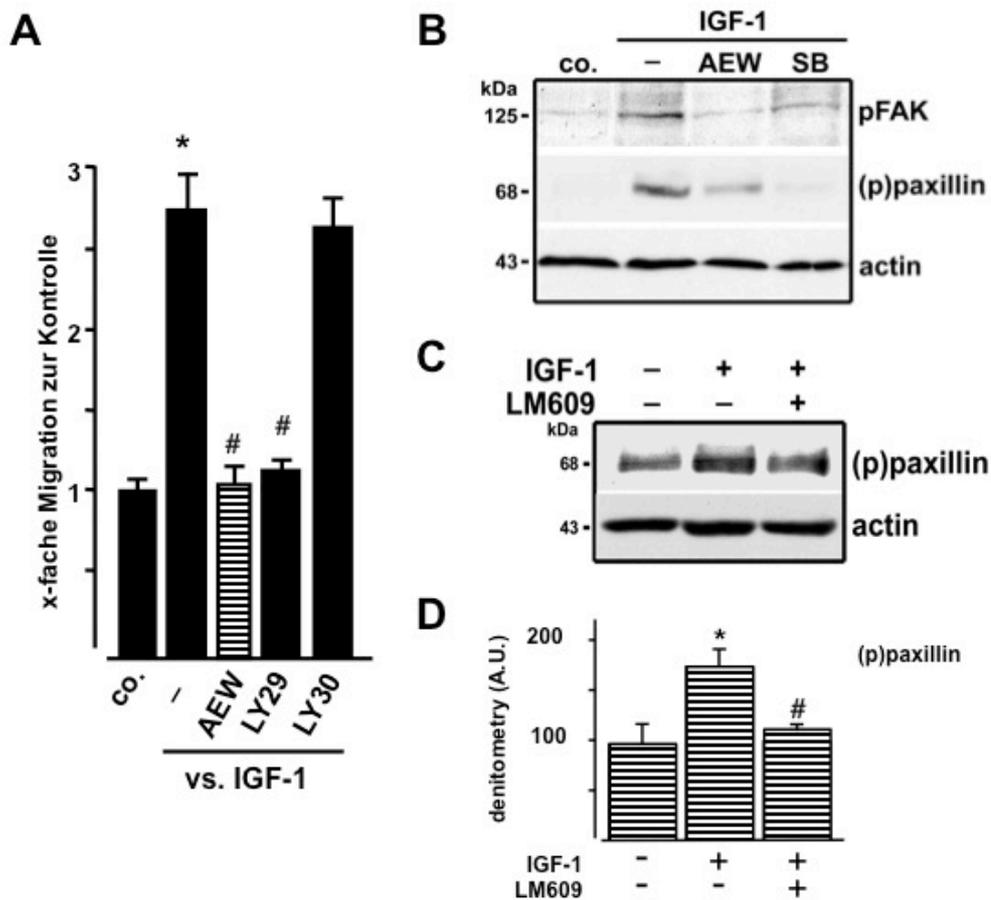


Abbildung 8. (A) Die IGF-1 induzierte Migration von THP-1/Makrophagen durch Vitronektin-gecoatete Filter (10 μ g/mL) wird durch Vorinkubation mit dem IGF-1R Tyrosinkinaseinhibitor NVP-AEW541 (AEW; 10 μ mol/L, 30min) oder dem PI-3 Kinase-Inhibitor LY294.002 (LY29; 10 μ mol/L, 30min) signifikant gehemmt. Die Kontrolle des PI-3 Kinase Inhibitors LY303.511 (LY30; 10 μ mol/L, 30 min) zeigte keinen Einfluss. (* p <0.05 vs. Kontrolle (co.), # p <0.05 vs. IGF-1) (B) Western Blots zeigen, dass sowohl die Inhibition der IGF-1R Aktivierung durch NVP-AEW541 (AEW, 10 μ mol/L, 30 min) als auch die Inhibition des nachfolgenden p38 MAP-Kinase durch SB203580 (SB, 10 μ mol/L, 30 min) die durch IGF-1 initiierte Phosphorylierung der Integrinadapterproteine FAK und Paxillin hemmt. (C) Adh rente Makrophagen (Vitronektin 10ng/mL) wurden mit dem α v β 3-blockierenden Antikörper LM609 (25 μ g/mL, 30min) inkubiert und dann mit IGF-1 (50ng/mL, 30min) stimuliert. Proteine wurden mit einem phospho-spezifischem Antikörper gegen Paxillin geblottet. (D) zeigt die semiquantitiven Densitometrie von (C). (* p <0.05 vs. unstimulierte Kontrolle, # p <0.05 vs. IGF-1). n=3

4.7 Einfluss von IGF-1 auf die Sekretion von MIP-1 α und TNF- α

Die Sekretion von Chemokinen und proinflammatorischen Zytokinen befähigt Makrophagen zur Rekrutierung weiterer Zellen sowie lokale Entzündungsreaktionen zu unterhalten [4]. Makrophagen sind die bedeutendste Quelle für Chemokine in der atherosklerotischen Läsion; sowohl MIP-1 α als auch TNF- α kolokalisieren mit makrophagenreichen Plaqueläsionen [4]. Der MIP-1 α Rezeptor CCR5 wird während der Differenzierung von Monozyten sowie auf T-Zellen exprimiert, MIP-1 α dient somit der Migration weiterer Entzündungszellen in der Plaqueregion [4]. TNF- α kommt eine Schlüsselrolle zu, da es eine Kaskade von Zytokinen freisetzt, die an der Inflammationsantwort teilnehmen [4].

Wir untersuchten daher die Zytokine TNF- α und MIP-1 α nach IGF-1 Stimulation in THP-1/Makrophagen mit Hilfe von ELISA Detektionskits. Als Kontrolle wurden die Zellen für 24 Stunden mit Lipopolysaccharid (LPS, 10 μ g/mL) stimuliert und dann deren Überstände auf MIP-1 α und TNF- α untersucht. Die Basalsekretion von MIP-1 α und TNF- α war in THP-1 Monozyten und Makrophagen sehr gering und ließ sich durch IGF-1 Stimulationen (50ng/mL, 24h) nicht steigern. Im Gegensatz zu IGF-1 kam es nach Inkubation von THP-1/Makrophagen mit dem bakteriellen Endotoxin LPS (10 μ g/mL, 24h) zu einer signifikanten Steigerung der Sekretion sowohl von MIP-1 α als auch von TNF- α (Tab. 2).

Zytokinsekretion nach IGF-1 Stimulation von THP-1/Makrophagen

Zelltyp (THP-1)	MIP-1α Sekretion	TNF-α Sekretion
Monozyten (basal)	1 ng/mL +/- 1 ng/mL	52 ng/mL +/- 27 ng/mL
Makrophagen (basal)	40 ng/mL +/- 12 ng/mL	21 ng/mL +/- 18 ng/mL
Makrophagen + IGF-1	56 ng/mL +/- 9 ng/mL	29 ng/mL +/- 9 ng/mL
Makrophagen + LPS	148 ng/mL +/- 19 ng/mL*	141 ng/mL +/- 22 ng/mL*

Tabelle 2. Dargestellt sind die Konzentrationen (ng/mL) von MIP-1 α und TNF- α der basalen Sekretion von THP-1 Monozyten und Makrophagen, sowie nach 24-stündiger Stimulation mit IGF-1 (50ng/mL) bzw. LPS (10 μ g/mL). *p<0.01 vs. THP-1 Monozyten bzw. Makrophagen (basal). n=3

5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Motilität und Zytokinsekretion von Makrophagen als Antwort auf eine Insulin-like Growth Factor-1 Stimulation. Wir demonstrieren, dass IGF-1 chemotaktisch auf humane THP-1/Makrophagen wirkt. Die IGF-1 vermittelte Migration von THP-1/Makrophagen ist von der Aktivierung des $\alpha v\beta 3$ Integrins abhängig, wohingegen die Matrix Metalloproteinasen MMP-2, -9 und MT1-MMP von untergeordneter Bedeutung scheinen.

Diese Arbeit zeigt, dass die Stimulation mit IGF-1 via Aktivierung des IGF-1R zur Integrinaktivierung führt. Dies ist *PI-3 Kinase/PKC/p38 MAP-Kinase*-abhängig und aktiviert $\alpha v\beta 3$ Integrin durch *inside-out signaling*. Immunfluoreszenz-Untersuchungen zeigen, dass $\alpha v\beta 3$ *inside-out* Aktivierung zur Kompartimentierung des Integrins zu *focal adhesion sites* führt und dort von einer gesteigerten Phosphorylierung des Integrin Adapterproteins Paxillin begleitet wird. Im Gegensatz dazu bleibt die Gesamtproteinmenge des $\alpha v\beta 3$ Integrins von IGF-1 unbeeinflusst. Somit könnte die durch IGF-1 gesteigerte Motilität von Makrophagen zu der chronisch-inflammatorischen Entzündung im Rahmen der Pathogenese der Atherosklerose beitragen.

In Übereinstimmung damit zeigten Kawachi et al. [41] in ihrer Studie an 330 gesunden, nicht-adipösen Männern (BMI < 27 kg/m², Alter 29-77 Jahre, keine kardiovaskulären Vorerkrankungen) eine Korrelation zwischen der Intima-Media-Dicke der A. carotis (als Frühmarker für ein kardiovaskuläres Risiko) und IGF-1 sowie IGFBP-3 Serumspiegel. Auch konnte in einer Studie an 92 Männern mit hohem kardiovaskulärem Risikoprofil (statt gehabter Myokardinfarkt, Alter < 45 Jahre, Serumcholesterin > 5.2 mmol/L und / oder Serumtriglyceride > 1.6 mmol/L) durch Fibrattherapie der Serumspiegel an IGF-1 und IGFBP-1 signifikant gesenkt werden. Dies war assoziiert mit einer Reduktion im angiographisch-bestimmten minimalen Lumendurchmesser der Koronararterien (als Marker für eine Progression der koronaren Herzerkrankung) [56].

Jedoch lassen andere klinische Studien IGF-1 auch eine protektive Wirkung zu. So zeigten Juul et al. [57] in einer prospektiven Studie (Laufzeit 15 Jahre; 600 Patienten), dass niedrige IGF-1 Serumspiegel, aber erhöhte IGFBP-3 Serumspiegel, mit der Entwicklung einer koronaren Herzerkrankung assoziiert sind.

Experimentelle Arbeiten zu IGF-1 und Atherosklerose haben sich vor allem mit glatten Gefäßmuskelzellen beschäftigt. In einem *in vivo* Restenose-Modell durch Ballonverletzung der Karotiden von Ratten konnte gezeigt werden, dass die Hemmung des IGF-1 Rezeptors durch ein IGF-1 ähnliches, jedoch funktionsloses D-Peptid die Replikation der glatten Gefäßmuskelzellen und damit die Neointimabildung/Restenose hemmt [43].

In *in vitro* Experimenten mit glatten Gefäßmuskelzellen konnte deren Proliferation durch die Hemmung der IGF-1R Aktivierung und des davon abhängigen *PI3-Kinase* und *MAP-Kinase signaling* durch die Hemmung der Proprotein Convertase Furin gehemmt werden [53]. Zusätzlich wurde dabei die IGF-1/IGF-1R-abhängige Expression/Aktivierung von MT1-MMP und MMP-2 und damit die Migration der glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte gehemmt [53].

Trotz der Untersuchungen zur Funktion von IGF-1 bei chronisch-inflammatorischen Prozessen gibt es somit nur wenige Arbeiten, die sich mit Makrophagen und IGF-1 auseinandersetzen [47; 48; 58; 59; 60]. Dabei stellen Monozyten/Makrophagen in atherosklerotischem Gewebe die entscheidende zelluläre Komponente dar, da sie an allen Stadien der chronischen Inflammation beteiligt sind [4]. Darüber hinaus synthetisieren sie lokal, autokrin und parakrin wirkend IGF-1 [31; 61]. So zeigten Kirstein et al. [62], dass durch Hyperglykämie vermehrt entstehende nicht-enzymatisch glykosylierte Proteine (*Advanced Glycolation End products* ‚AGE‘) zur Sekretion von IGF-1 in humanen Monozyten führten. Neben AGE führt auch Zytokine wie IL-4 und IL-13 *in vitro* in Mausmakrophagen zur vermehrten Produktion von IGF-1 mRNA und Protein [61].

Im Gegensatz zu diesen proinflammatorischen Funktionen wurde kürzlich in einer Studie gezeigt, dass IGF-1 in Hoch-Fettdiät gefütterten ApoE-

defizienten Mäusen oxidativen Stress und die Expression (mRNA) von Zytokinen (TNF- α und IL-6) reduzieren und somit zu einer Verringerung der Entzündung führten [59]. Obwohl in der Studie die IGF-1 Infusion zu einer Reduktion der Zytokinsekretion und der Makrophagen-beinhaltenen Plaqueregion führte, konnte weder die Gesamtgröße des Plaques noch die Makrophagendichte pro Läsionsfläche (als Index für die atherosklerotische Belastung) signifikant gesenkt werden [59]. Somit konnte diese Studie - auch wenn die Zytokinsekretion und der oxidative Stress durch IGF-1 vermindert wurden - keinen direkten Effekt von IGF-1 auf die Expression von Makrophagen in den atherosklerotischen Läsionen von fettgefütterten ApoE-defizienten Mäusen nachweisen.

Die hier dargestellten Tiermodelle sind nur bedingt vergleichbar. So steht bei dem Ballonverletzung/Restenosemodell die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen im Vordergrund, wohingegen im fettgefütterten ApoE-Modell die Inflammation und Makrophagenproliferation und Migration im Vordergrund stehen.

Interessanterweise zeigten auch klinische Studien an Tumorpatienten eine Assoziation von IGF-1/IGF-1R und die Entstehung und Progression unterschiedlicher Karzinome. In Schweden stellte man bei einer Fall-Kontroll - Studie von 110 Patienten und 336 Kontroll-Patienten fest, dass ein erhöhter IGF-1 Plasmaspiegel mit einem 2.5fach gesteigerten Risiko, an kolorektalem Karzinom zu erkranken, verbunden ist [63]. Chan et al. [64] publizierten eine Fall-Kontroll - Studie an 304 Probanden, in der Männer mit erhöhtem IGF-1 Plasmaspiegel ein 4,3fach erhöhtes Risiko hatten, an Prostatakarzinom zu erkranken. Neben der gesteigerten Expression des IGF-1R bei Kolon- und Prostata-Karzinomen konnte in Östrogen-Rezeptor positiven Mammakarzinom-Zellen eine *loss-of-function* Mutation der Phosphatase PTEN identifiziert werden, welche zu einer erhöhten Aktivität der IGF-1R Tyrosinkinase führt [65]. In *in vitro* Experimenten an Lewis Lungenkarzinomzellen wurde gezeigt, dass eine IGF-1 Konzentration von 10 ng/mL via *PI-3 Kinase/Akt/mTOR* Signalwege, die Expression und Aktivität der MMPs MT1-MMP/MMP-2 steigerte [66], während höhere Konzentrationen

von IGF-1 (100ng/mL) die MMP-2 Expression über c-Raf/MEK/ERK Aktivierung inhibierten [44]. Somit könnte dies auf einen protektiven bzw. Tumor-fördernden Effekt von IGF-1, entsprechend der Konzentration, hinweisen.

Da gezeigt wurde, dass IGF-1 Migration und Invasion von glatten Gefäßmuskelzellen und Tumorzellen durch die Aktivierung von MT1-MMP und MMP-2 via *PI-3 Kinase* und *mTOR* Signaltransduktionswege vermittelt [44; 53], untersuchten wir die IGF-1 induzierte Migration von THP-1/Makrophagen bezüglich einer möglichen Beteiligung dieser MMPs. Jedoch zeigt diese Arbeit, dass MMPs von untergeordneter Bedeutung für die IGF-1 vermittelte Migration von THP-1/Makrophagen sind. Die Hemmung der MMP-Aktivität mit dem Hydroxymat Breitspektrum MMP-Inhibitor GM6001 in Migrationsassays hatte auf die IGF-1 induzierte Migration keinen Einfluss. Weiterhin untersuchten wir auch die Expression verschiedener MMPs nach IGF-1 Stimulation von THP-1/Makrophagen in Western Blot und Zymographieexperimenten. Weder die Stimulation von THP-1/Makrophagen mit 50ng/mL IGF-1 noch die Stimulation mit einer Konzentrationen von 100ng/mL hatte Einfluss auf die Aktivierung von MT1-MMP, MMP-2 oder MMP-9. Auch die Expression der physiologischen MMP-Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 waren nach IGF-1 Stimulation von THP-1/Makrophagen unbeeinflusst.

Für die Zellmotilität sind neben den MMPs vor allem α_v Integrine von Bedeutung. Wir untersuchten deswegen die Expression von α_v Integrin während der Transformation von Monozyten \rightarrow Makrophagen sowie in THP-1/Makrophagen nach Stimulation mit IGF-1. Wir zeigen, dass die Transformation von Monozyten \rightarrow Makrophagen, welche Zellen befähigt, an chronischen Entzündungsreaktionen teilzunehmen [8], sowohl mit einem Anstieg der IGF-1R- und der α_v Integrin-Expression als auch mit einer Zunahme der Enzymaktivität der den Pro-IGF-1R [32; 54] und Pro- α_v Integrin [38] aktivierenden Convertase Furin verbunden ist. Die gesteigerte Expression von Integrin α_v und des IGF-1R sowie der zu ihrer Aktivierung

notwendigen Proprotein Convertase Furin könnte somit zum aggressiveren Phänotyp von Makrophagen beitragen.

Im Gegensatz zur Steigerung der Integrinexpression während der Monozyten → Makrophagentransformation blieb α_v Integrin Gesamtprotein aber durch Stimulation der THP-1/Makrophagen mit IGF-1 unbeeinflusst; α_v *de-novo* Synthese scheint in THP-1/Makrophagen von untergeordneter Bedeutung bei der IGF-1 -vermittelten Makrophagenchemotaxis zu sein.

Dies steht im Gegensatz zu einer kürzlich publizierten Studie, welche einen Anstieg von fokalen Adhäsionsregionen zusammen mit einer Hochregulation von $\alpha_v\beta_3$ Gesamtprotein in humanen androgen-unabhängigen Prostatakarzinomzellen infolge IGF-1 Stimulation zeigt, was zu einer IGF-1 induzierten gesteigerten Tumorzellmigration führte [45].

Die hier vorliegende Arbeit zeigt, dass die IGF-1 vermittelte THP-1/Makrophagenchemotaxis durch Integrinenhemmung mittels spezifischer Integrin-blockierender RGD Peptide und auch durch die spezifischen Integrin-hemmenden Antikörper gegen $\alpha_v\beta_3$ -Integrin (LM609) und gegen β_3 Integrin (F11) signifikant gehemmt werden kann. Dies erfordert jedoch keine gesteigerte α_v Integrin Synthese, sondern ein IGF-1/IGF-1R vermitteltes $\alpha_v\beta_3$ Integrin *inside-out signaling*. Dies zeigte sich in der Untersuchung von *focal adhesion sites* durch Immunfluoreszenzfärbungen mit spezifischen Antikörpern für $\alpha_v\beta_3$ Integrin und Phospho-Paxillin, in welcher es nach IGF-1 Stimulation zur Bildung von $\alpha_v\beta_3$ -kongruenten fokalen Adhäsionskomplexen und der gesteigerten Phosphorylierung des Integrin Adapterproteins Paxillin kam. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit einer Studie an humanen Trophoblasten, bei denen es nach IGF-1 Stimulation zur Phosphorylierung von Paxillin und FAK kam [67]. Elektronenmikroskopisch zeigte sich begleitend die Ausbildung von Membranausläufern, sogenannten 'Lamellipodien' [67].

IGF-1 vermittelt seine Wirkungen durch den IGF-1R, für dessen Funktion eine Aktivierung durch Furin-Convertase vermitteltes *cleavage* des Pro-IGF-1R essentiell ist [54]. So zeigten Khatib et al. [32], dass die Inhibition der IGF-1R Aktivierung durch den Furin Proprotein Convertase Inhibitor α_1 -Antitrypsin

Portland (α 1-PDX) das sich anschließende IGF-1 Rezeptorsignaling hemmt. Durch eine Inokulierung von Mäusen mit α 1-PDX transfizierten Tumorzellen konnten die Autoren eine verzögerte Tumorentwicklung sowie eine reduzierte Tumorzellinvasion durch Furin- und damit IGF-1R Inhibition zeigen [32].

In Übereinstimmung damit zeigen wir, dass die Hemmung der IGF-1R Aktivierung durch Inhibition von Furin die Autophosphorylierung des IGF-1R an Tyrosin signifikant hemmt. Dieser Effekt war vergleichbar mit einer direkten Hemmung der Rezeptortyrosinkinase durch den spezifischen IGF-1R Tyrosinkinase Inhibitor NVP-AEW541. NVP-AEW541 wird in der Tumorforschung eingesetzt, um selektiv den IGF-1R zu hemmen, ohne dabei den Insulinrezeptor zu beeinflussen. Mit diesem teilt der IGF-1R 84% Homologie [68].

Weiterhin zeigen wir anhand von Western Blot Experimenten und mittels selektiver pharmakologischer Inhibitoren der Signaltransduktionswege, dass die Aktivierung des IGF-1R in THP-1/Makrophagen zur nachfolgenden Phosphorylierung des *PI-3 Kinase* Substrates *Akt* und anschließend durch die Aktivierung von *Proteinkinase C* zur Aktivierung von *p38 MAP-Kinase* führt. Die Inhibition der Pro-IGF-1R Aktivierung durch Inhibition von Furin mit dem spezifischen Inhibitor dec-CMK [34] oder durch Inhibition der IGF-1R Tyrosinkinase mittels NVP-AEW541 konnten die Aktivierung der IGF-1R abhängigen *PI-3 Kinase/PKC/p38 MAP-Kinase* Signalwege hemmen.

Wir zeigen auch, dass der Inhibitor der IGF-1R Tyrosinkinase NVP-AEW541 und auch der spezifische Inhibitor der *p38 MAK-Kinase* SB203580 die IGF-1 induzierte Phosphorylierung von Paxillin und FAK hemmen. Die Inhibition der Phosphorylierung dieser Integrin Adaptarproteine ist ein Ausdruck einer Inhibition der Integrinaktivierung. Im Gegensatz dazu wurde an kardialen Fibroblasten gezeigt, dass die durch Angiotensin II gesteigerte, β 1-Integrin vermittelte Adhäsion an Kollagen-1 zwar Integrin *inside-out signaling* abhängig ist, aber die Phosphorylierung von β 1-Integrin voraussetzt [17].

Die hier untersuchten Integrin Adaptarproteinen Paxillin und FAK haben bei der Adhäsion und Migration von Zellen wichtige Bedeutung. Paxillin reguliert die Aktivität von GTPasen der Rho - Familie, welche an der Umordnung des Aktin-Zytoskeletts und damit an der Aktin-assoziierten Zelladhäsion beteiligt

sind [69]. Die C-terminale FAT Domäne von FAK vermittelt die Bindung von Integrinen und fokalen Adhäsionen, zu dem besitzt sie Bindungsstellen für Integrin-assoziierte Proteine wie Paxillin [70]. Punktmutationen in dieser Domäne unterbrechen die Paxillinbindung und verhindern somit die Integrin Aktivierung und Bildung von FAK-assoziierten fokalen Adhäsionen [70].

Da ebenso wie der Pro-IGF-1R auch die Pro- α_v Integrinuntereinheit durch Furin endoproteolytisch aktiviert wird [38] und dies bei der Untersuchung der IGF-1R -vermittelten Migration von THP-1/Makrophagen eine Differenzierung IGF-1R bzw. α_v -abhängiger Effekte unmöglich machen würde, verwendeten wir in den Migrationsassays zur Inhibition der IGF-1R Aktivität nur NVP-AEW541, welcher die Pro-Integrinaktivierung nicht beeinflusst. Die potente Inhibition der IGF-1/IGF-1R vermittelten Migration von THP-1/Makrophagen durch NVP-AEW541 als auch den *PI-3 Kinase* Inhibitor LY303.511 zeigt, dass die IGF-1-gesteigerte Migration IGF-1R/*PI-3-Kinase* -abhängig ist.

Mittels Western Blot Experimenten zeigen wir, dass die Inhibition dieser Signaltransduktionswege die IGF-1 vermittelte Phosphorylierung von FAK und Paxillin hemmt. Zusammenfassend führt damit IGF-1 via IGF-1R Aktivierung durch eine *PI3-Kinase/PKC/p38 MAP-Kinase* - abhängige Signaltransduktion zur Bildung von fokalen Integrinadhäsionssitzen assoziiert mit einer gesteigerten Phosphorylierung von Integrinadaptarproteinen, welches zusammenfassend als *inside-out signaling* bezeichnet wird. Im Gegensatz dazu zeigten andere Studien an glatten Gefäßmuskelzellen, dass in diesen die Integrin *inside-out signaling* vermittelte Migration vor allem auf der Aktivierung von PKC und ERK-1/2 MAP-Kinasen basiert [71].

Weiterhin untersuchten wir die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine MIP-1 α und TNF- α infolge IGF-1 Stimulation in THP-1/Makrophagen. Der MIP-1 α Rezeptor CCR5 wird während der Monozyten - \rightarrow Makrophagen - transformation vermehrt exprimiert, außerdem wird MIP-1 α von T-Zellen und Makrophagen produziert und dient der Chemotaxis weiterer Entzündungszellen in der Region des atherosklerotischen Plaque [4]. TNF- α wird von Zytokinen wie IL-1 und LPS in Makrophagen induziert und initiiert die

Freisetzung einer Kaskade von Zytokinen, die an der Inflammationsantwort teilnehmen [4]. Renier et al. [48] demonstrierten eine Steigerung der basalen und LPS-induzierten Sekretion von TNF- α in murinen ANA-1 Makrophagen. Jedoch konnten unsere Ergebnisse keine Beeinflussung der Sekretion von TNF- α oder MIP-1 α durch IGF-1 Stimulation in THP-1/Makrophagen zeigen, wohingegen LPS zu einer deutlichen Steigerung führte. Somit konnten wir bezüglich der untersuchten Zytokine MIP-1 α und TNF- α keinen pro-inflammatorischen Effekt von IGF-1/IGF-1R in THP-1/Makrophagen zeigen.

Einschränkend ist, dass die Verwendung von Zelllinien bezüglich einer *in vivo* Situation nur bedingt aussagefähig ist. Jedoch sind THP-1/Makrophagen im Vergleich den nativen humanen Makrophagen am ähnlichsten [52]. Sowohl Gene wie α_v Integrin, MMPs als auch Wachstumsfaktor-Rezeptoren sind vergleichbar exprimiert, auch die Monozyten - \rightarrow Makrophagendifferenzierung ist vergleichbar [52]. Darüber hinaus zeichnen sich Zelllinien wie THP-1 Monozyten durch einfache Kultivierbarkeit, Reinheit und Stabilität aus, was die Durchführung von *in vitro* Versuchen erleichtert.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass IGF-1 die Motilität von THP-1/Makrophagen durch IGF-1R vermitteltes *PI-3 Kinase/PKC/p38 MAP-Kinase* abhängiges Integrin $\alpha_v\beta_3$ *inside-out signaling* steigert. Da die Invasion von Makrophagen in der Initiation und Progression der Atherosklerose von entscheidender Bedeutung ist [8; 40], IGF-1/IGF-1R in humanen atherosklerotischen Läsionen gesteigert exprimiert wird [40] sowie die Inhibition von IGF-1R in Tierversuchen die Neointimabildung hemmt [43], könnten diese Ergebnisse zum weiteren Verständnis der Funktion von IGF-1/IGF-1R in der Pathogenese der Atherosklerose beitragen.

6. Zusammenfassung

Migration von Makrophagen nimmt eine zentrale Stellung in der Initiation und Progression der Atherosklerose ein. Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) ist in Makrophagen in humanen Atheromen und in Tierversuchen stark exprimiert, seine Bedeutung für die Motilität von Makrophagen ist jedoch ungeklärt. Das Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion von IGF-1/IGF-1R für die Migration von THP-1/Makrophagen zu analysieren und die daran beteiligten Signalwege zu identifizieren sowie die Bedeutung von Integrinen und/oder Matrix Metalloproteinasen hierbei zu klären.

Checkerbox-Experimente zeigten eine starke chemotaktische Wirkung von IGF-1 auf THP-1/Makrophagen. Die IGF-1 induzierte Migration wurde durch RGD-Peptide und $\alpha v \beta 3$ blockierende Antikörper signifikant gehemmt, die Inhibition von MMPs hatte jedoch keinen Einfluss. Western Blot Experimente zeigten, dass IGF-1 weder die Aktivierung und Proteinkonzentrationen von MT1-MMP, MMP-2 und MMP-9 noch deren physiologischen Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 signifikant beeinflusst. Ebenso führte die IGF-1 Stimulation humaner THP-1/Makrophagen nicht zu einer gesteigerten αv Integrinexpression. Jedoch zeigte sich nach IGF-1 Stimulation eine Kompartimentierung von $\alpha v \beta 3$ Integrin und Phosphorylierung seines Adapterproteins Paxillin zu fokalen Adhäsionskomplexen. Experimente mit spezifischen pharmakologischen Inhibitoren zeigten, dass die IGF-1 abhängige Aktivierung der fokalen Adhäsionskinase (FAK) und Paxillin sowie die daraus resultierende Migration via IGF-1/IGF-1R vermitteltes, *PI-3 Kinase/PKC/p38 MAP-Kinase* abhängiges $\alpha v \beta 3$ Integrin *inside-out signaling* induziert wird. Diese IGF-1/IGF-1R abhängige, Integrin-vermittelte Migration von Makrophagen könnte somit von Bedeutung für die Initiierung und Progression der Atherosklerose sein.

7. Literaturverzeichnis

- [1] D. Lloyd-Jones, R. Adams, M. Carnethon, G. De Simone, T.B. Ferguson, K. Flegal, E. Ford, K. Furie, A. Go, K. Greenlund, N. Haase, S. Hailpern, M. Ho, V. Howard, B. Kissela, S. Kittner, D. Lackland, L. Lisabeth, A. Marelli, M. McDermott, J. Meigs, D. Mozaffarian, G. Nichol, C. O'Donnell, V. Roger, W. Rosamond, R. Sacco, P. Sorlie, R. Stafford, J. Steinberger, T. Thom, S. Wasserthiel-Smoller, N. Wong, J. Wylie-Rosett, and Y. Hong, Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 119 (2009) e21-181.
- [2] T.A. Gaziano, A. Bitton, S. Anand, S. Abrahams-Gessel, and A. Murphy, Growing epidemic of coronary heart disease in low- and middle-income countries. *Curr Probl Cardiol* 35 72-115.
- [3] T.A. Springer, Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76 (1994) 301-14.
- [4] B. Osterud, and E. Bjorklid, Role of monocytes in atherogenesis. *Physiol Rev* 83 (2003) 1069-112.
- [5] H. Li, M.I. Cybulsky, M.A. Gimbrone, Jr., and P. Libby, An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler Thromb* 13 (1993) 197-204.
- [6] Y. Zhu, H.L. Liao, J.H. Lin, L. Verna, and M.B. Stemerman, Low-density lipoprotein augments interleukin-1-induced vascular adhesion molecule expression in human endothelial cells. *Atherosclerosis* 144 (1999) 357-65.
- [7] B.V. Khan, S.S. Parthasarathy, R.W. Alexander, and R.M. Medford, 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 (1995) 1262-70.
- [8] P. Libby, P.M. Ridker, and G.K. Hansson, Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol* 54 (2009) 2129-38.
- [9] L. Boring, J. Gosling, M. Cleary, and I.F. Charo, Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 394 (1998) 894-7.
- [10] S.M. Schwartz, Z.S. Galis, M.E. Rosenfeld, and E. Falk, Plaque rupture in humans and mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27 (2007) 705-13.
- [11] E. Shantsila, and G.Y. Lip, Monocytes in acute coronary syndromes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29 (2009) 1433-8.
- [12] R. Virmani, F.D. Kolodgie, A.P. Burke, A. Farb, and S.M. Schwartz, Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20 (2000) 1262-75.
- [13] D.E. Ingber, Mechanical signaling and the cellular response to extracellular matrix in angiogenesis and cardiovascular physiology. *Circ Res* 91 (2002) 877-87.

- [14] M.G. Coppelino, and S. Dedhar, Bi-directional signal transduction by integrin receptors. *Int J Biochem Cell Biol* 32 (2000) 171-88.
- [15] R.O. Hynes, Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69 (1992) 11-25.
- [16] C.G. Gahmberg, S.C. Fagerholm, S.M. Nurmi, T. Chavakis, S. Marchesan, and M. Gronholm, Regulation of integrin activity and signalling. *Biochim Biophys Acta* 1790 (2009) 431-44.
- [17] P. Stawowy, C. Margeta, F. Blaschke, C. Lindschau, C. Spencer-Hansch, M. Leitges, G. Biagini, E. Fleck, and K. Graf, Protein kinase C epsilon mediates angiotensin II-induced activation of beta1-integrins in cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 67 (2005) 50-9.
- [18] M. Hoshiga, C.E. Alpers, L.L. Smith, C.M. Giachelli, and S.M. Schwartz, Alpha-v beta-3 integrin expression in normal and atherosclerotic artery. *Circ Res* 77 (1995) 1129-35.
- [19] D. Weerasinghe, K.P. McHugh, F.P. Ross, E.J. Brown, R.H. Gisler, and B.A. Imhof, A role for the alphavbeta3 integrin in the transmigration of monocytes. *J Cell Biol* 142 (1998) 595-607.
- [20] P. Dufourcq, T. Couffinal, P. Alzieu, D. Daret, C. Moreau, C. Duplaa, and J. Bonnet, Vitronectin is up-regulated after vascular injury and vitronectin blockade prevents neointima formation. *Cardiovasc Res* 53 (2002) 952-62.
- [21] K.R. Coleman, G.A. Braden, M.C. Willingham, and D.C. Sane, Vitaxin, a humanized monoclonal antibody to the vitronectin receptor (alphavbeta3), reduces neointimal hyperplasia and total vessel area after balloon injury in hypercholesterolemic rabbits. *Circ Res* 84 (1999) 1268-76.
- [22] G.G. Bishop, J.A. McPherson, J.M. Sanders, S.E. Hesselbacher, M.J. Feldman, C.A. McNamara, L.W. Gimple, E.R. Powers, S.A. Mousa, and I.J. Sarembock, Selective alpha(v)beta(3)-receptor blockade reduces macrophage infiltration and restenosis after balloon angioplasty in the atherosclerotic rabbit. *Circulation* 103 (2001) 1906-11.
- [23] A.C. Newby, Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28 (2008) 2108-14.
- [24] R. Visse, and H. Nagase, Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92 (2003) 827-39.
- [25] Z.S. Galis, G.K. Sukhova, M.W. Lark, and P. Libby, Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 94 (1994) 2493-503.
- [26] I. Yana, and S.J. Weiss, Regulation of membrane type-1 matrix metalloproteinase activation by proprotein convertases. *Mol Biol Cell* 11 (2000) 2387-401.
- [27] S. Matias-Roman, B.G. Galvez, L. Genis, M. Yanez-Mo, G. de la Rosa, P. Sanchez-Mateos, F. Sanchez-Madrid, and A.G. Arroyo, Membrane type 1-matrix metalloproteinase is involved in migration of human monocytes and is regulated through their interaction with fibronectin or endothelium. *Blood* 105 (2005) 3956-64.

- [28] P. Stawowy, H. Meyborg, D. Stibenz, N. Borges Pereira Stawowy, M. Roser, U. Thanabalasingam, J.P. Veinot, M. Chretien, N.G. Seidah, E. Fleck, and K. Graf, Furin-like proprotein convertases are central regulators of the membrane type matrix metalloproteinase-pro-matrix metalloproteinase-2 proteolytic cascade in atherosclerosis. *Circulation* 111 (2005) 2820-7.
- [29] G. Derosa, A. D'Angelo, F. Scalise, M.A. Avanzini, C. Tinelli, E. Peros, E. Fogari, and A.F. Cicero, Comparison between metalloproteinases-2 and -9 in healthy subjects, diabetics, and subjects with acute coronary syndrome. *Heart Vessels* 22 (2007) 361-70.
- [30] K. Kappert, H. Meyborg, B. Baumann, V. Furundzija, J. Kaufmann, K. Graf, D. Stibenz, E. Fleck, and P. Stawowy, Integrin cleavage facilitates cell surface-associated proteolysis required for vascular smooth muscle cell invasion. *Int J Biochem Cell Biol* 41 (2009) 1511-7.
- [31] P. Delafontaine, Y.H. Song, and Y. Li, Expression, regulation, and function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 binding proteins in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24 (2004) 435-44.
- [32] A.M. Khatib, G. Siegfried, A. Prat, J. Luis, M. Chretien, P. Metrakos, and N.G. Seidah, Inhibition of proprotein convertases is associated with loss of growth and tumorigenicity of HT-29 human colon carcinoma cells: importance of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor processing in IGF-1-mediated functions. *J Biol Chem* 276 (2001) 30686-93.
- [33] D.F. Steiner, D. Cunningham, L. Spigelman, and B. Aten, Insulin biosynthesis: evidence for a precursor. *Science* 157 (1967) 697-700.
- [34] N.G. Seidah, G. Mayer, A. Zaid, E. Rousselet, N. Nassoury, S. Poirier, R. Essalmani, and A. Prat, The activation and physiological functions of the proprotein convertases. *Int J Biochem Cell Biol* 40 (2008) 1111-25.
- [35] N.G. Seidah, and M. Chretien, Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res* 848 (1999) 45-62.
- [36] C.M. Dubois, F. Blanchette, M.H. Laprise, R. Leduc, F. Grondin, and N.G. Seidah, Evidence that furin is an authentic transforming growth factor-beta1-converting enzyme. *Am J Pathol* 158 (2001) 305-16.
- [37] G. Siegfried, A. Basak, W. Prichett-Pejic, N. Scamuffa, L. Ma, S. Benjannet, J.P. Veinot, F. Calvo, N. Seidah, and A.M. Khatib, Regulation of the stepwise proteolytic cleavage and secretion of PDGF-B by the proprotein convertases. *Oncogene* 24 (2005) 6925-35.
- [38] J.C. Lissitzky, J. Luis, J.S. Munzer, S. Benjannet, F. Parat, M. Chretien, J. Marvaldi, and N.G. Seidah, Endoproteolytic processing of integrin pro-alpha subunits involves the redundant function of furin and proprotein convertase (PC) 5A, but not paired basic amino acid converting enzyme (PACE) 4, PC5B or PC7. *Biochem J* 346 Pt 1 (2000) 133-8.
- [39] P. Stawowy, H. Kallisch, N. Borges Pereira Stawowy, D. Stibenz, J.P. Veinot, M. Grafe, N.G. Seidah, M. Chretien, E. Fleck, and K. Graf, Immunohistochemical localization of subtilisin/kexin-like proprotein convertases in human atherosclerosis. *Virchows Arch* 446 (2005) 351-9.
- [40] M.B. Grant, T.J. Wargovich, E.A. Ellis, R. Tarnuzzer, S. Caballero, K. Estes, M. Rossing, P.E. Spoerri, and C. Pepine, Expression of IGF-I,

- IGF-I receptor and IGF binding proteins-1, -2, -3, -4 and -5 in human atherectomy specimens. *Regul Pept* 67 (1996) 137-44.
- [41] S. Kawachi, N. Takeda, A. Sasaki, Y. Kokubo, K. Takami, H. Sarui, M. Hayashi, N. Yamakita, and K. Yasuda, Circulating insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding protein-3 are associated with early carotid atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25 (2005) 617-21.
- [42] B. Zhu, G. Zhao, D.P. Witte, D.Y. Hui, and J.A. Fagin, Targeted overexpression of IGF-I in smooth muscle cells of transgenic mice enhances neointimal formation through increased proliferation and cell migration after intraarterial injury. *Endocrinology* 142 (2001) 3598-606.
- [43] P. Hayry, M. Myllarniemi, E. Aavik, S. Alatalo, P. Aho, S. Yilmaz, A. Raisanen-Sokolowski, G. Cozzone, B.A. Jameson, and R. Baserga, Stable D-peptide analog of insulin-like growth factor-1 inhibits smooth muscle cell proliferation after carotid ballooning injury in the rat. *Faseb J* 9 (1995) 1336-44.
- [44] D. Zhang, M. Bar-Eli, S. Meloche, and P. Brodt, Dual regulation of MMP-2 expression by the type 1 insulin-like growth factor receptor: the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and Raf/ERK pathways transmit opposing signals. *J Biol Chem* 279 (2004) 19683-90.
- [45] M.M. Marelli, R.M. Moretti, P. Procacci, M. Motta, and P. Limonta, Insulin-like growth factor-I promotes migration in human androgen-independent prostate cancer cells via the α v β 3 integrin and PI3-K/Akt signaling. *Int J Oncol* 28 (2006) 723-30.
- [46] A.K. Berfield, and C.K. Abrass, IGF-1 induces foam cell formation in rat glomerular mesangial cells. *J Histochem Cytochem* 50 (2002) 395-403.
- [47] Z. Hochberg, P. Hertz, G. Maor, J. Oiknine, and M. Aviram, Growth hormone and insulin-like growth factor-I increase macrophage uptake and degradation of low density lipoprotein. *Endocrinology* 131 (1992) 430-5.
- [48] G. Renier, I. Clement, A.C. Desfaits, and A. Lambert, Direct stimulatory effect of insulin-like growth factor-I on monocyte and macrophage tumor necrosis factor- α production. *Endocrinology* 137 (1996) 4611-8.
- [49] H. Bai, M.J. Pollman, Y. Inishi, and G.H. Gibbons, Regulation of vascular smooth muscle cell apoptosis. Modulation of bad by a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Circ Res* 85 (1999) 229-37.
- [50] J. Haylor, I. Singh, and A.M. el Nahas, Nitric oxide synthesis inhibitor prevents vasodilation by insulin-like growth factor I. *Kidney Int* 39 (1991) 333-5.
- [51] S. Tsuchiya, Y. Kobayashi, Y. Goto, H. Okumura, S. Nakae, T. Konno, and K. Tada, Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res* 42 (1982) 1530-6.
- [52] J. Auwerx, The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia* 47 (1991) 22-31.
- [53] P. Stawowy, H. Kallisch, A. Kilimnik, C. Margeta, N.G. Seidah, M. Chretien, E. Fleck, and K. Graf, 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 (2004) 531-8.
- [54] M. Lehmann, F. Andre, C. Bellan, M. Remacle-Bonnet, F. Garrouste, F. Parat, J.C. Lissitsky, J. Marvaldi, and G. Pommier, Deficient processing and activity of type I insulin-like growth factor receptor in the furin-deficient LoVo-C5 cells. *Endocrinology* 139 (1998) 3763-71.
- [55] S. Hallenberger, V. Bosch, H. Angliker, E. Shaw, H.D. Klenk, and W. Garten, Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* 360 (1992) 358-61.
- [56] G. Ruotolo, P. Bavenholm, K. Brismar, S. Efendic, C.G. Ericsson, U. de Faire, J. Nilsson, and A. Hamsten, Serum insulin-like growth factor-I level is independently associated with coronary artery disease progression in young male survivors of myocardial infarction: beneficial effects of bezafibrate treatment. *J Am Coll Cardiol* 35 (2000) 647-54.
- [57] E. Conti, C. Carrozza, E. Capoluongo, M. Volpe, F. Crea, C. Zuppi, and F. Andreotti, Insulin-like growth factor-1 as a vascular protective factor. *Circulation* 110 (2004) 2260-5.
- [58] M. Fernandez, A. Medina, F. Santos, E. Carbajo, J. Rodriguez, J. Alvarez, and A. Cobo, Exacerbated inflammatory response induced by insulin-like growth factor I treatment in rats with ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 12 (2001) 1900-7.
- [59] S. Sukhanov, Y. Higashi, S.Y. Shai, C. Vaughn, J. Mohler, Y. Li, Y.H. Song, J. Titterington, and P. Delafontaine, IGF-1 reduces inflammatory responses, suppresses oxidative stress, and decreases atherosclerosis progression in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27 (2007) 2684-90.
- [60] K. Kappert, H. Meyborg, M. Clemenz, K. Graf, E. Fleck, U. Kintscher, and P. Stawowy, Insulin facilitates monocyte migration: a possible link to tissue inflammation in insulin-resistance. *Biochem Biophys Res Commun* 365 (2008) 503-8.
- [61] M.W. Wynes, and D.W. Riches, Induction of macrophage insulin-like growth factor-I expression by the Th2 cytokines IL-4 and IL-13. *J Immunol* 171 (2003) 3550-9.
- [62] M. Kirstein, C. Aston, R. Hintz, and H. Vlassara, Receptor-specific induction of insulin-like growth factor I in human monocytes by advanced glycosylation end product-modified proteins. *J Clin Invest* 90 (1992) 439-46.
- [63] M.N. Pollak, E.S. Schernhammer, and S.E. Hankinson, Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Cancer* 4 (2004) 505-18.
- [64] J.M. Chan, M.J. Stampfer, E. Giovannucci, P.H. Gann, J. Ma, P. Wilkinson, C.H. Hennekens, and M. Pollak, Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. *Science* 279 (1998) 563-6.
- [65] T.W. Miller, M. Perez-Torres, A. Narasanna, M. Guix, O. Stal, G. Perez-Tenorio, A.M. Gonzalez-Angulo, B.T. Hennessy, G.B. Mills, J.P. Kennedy, C.W. Lindsley, and C.L. Arteaga, Loss of Phosphatase and Tensin homologue deleted on chromosome 10 engages ErbB3 and insulin-like growth factor-I receptor signaling to promote antiestrogen resistance in breast cancer. *Cancer Res* 69 (2009) 4192-201.

- [66] D. Zhang, and P. Brodt, Type 1 insulin-like growth factor regulates MT1-MMP synthesis and tumor invasion via PI 3-kinase/Akt signaling. *Oncogene* 22 (2003) 974-82.
- [67] M. Kabir-Salmani, S. Shiokawa, Y. Akimoto, K. Sakai, S. Nagamatsu, K. Sakai, Y. Nakamura, A. Lotfi, H. Kawakami, and M. Iwashita, Alphavbeta3 integrin signaling pathway is involved in insulin-like growth factor I-stimulated human extravillous trophoblast cell migration. *Endocrinology* 144 (2003) 1620-30.
- [68] C. Garcia-Echeverria, M.A. Pearson, A. Marti, T. Meyer, J. Mestan, J. Zimmermann, J. Gao, J. Brueggen, H.G. Capraro, R. Cozens, D.B. Evans, D. Fabbro, P. Furet, D.G. Porta, J. Liebetanz, G. Martiny-Baron, S. Ruetz, and F. Hofmann, In vivo antitumor activity of NVP-AEW541-A novel, potent, and selective inhibitor of the IGF-IR kinase. *Cancer Cell* 5 (2004) 231-9.
- [69] N.O. Deakin, and C.E. Turner, Paxillin comes of age. *J Cell Sci* 121 (2008) 2435-44.
- [70] S.K. Mitra, D.A. Hanson, and D.D. Schlaepfer, Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (2005) 56-68.
- [71] K. Kappert, V. Furundzija, J. Fritzsche, C. Margeta, J. Kruger, H. Meyborg, E. Fleck, and P. Stawowy, Integrin cleavage regulates bidirectional signalling in vascular smooth muscle cells. *Thromb Haemost* 103.

8. Abkürzungsverzeichnis

Arg	Arginin
α 1-PDX	α 1-Antitrypsin Portland
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CMK	Decanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-Chloromethylketon
FAK	Fokale Adhäsionskinase (focal adhesion kinase)
FKS	Fetales Kälberserum
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
IRS-1	Insulin Rezeptor Substrat-1
kDa	Kilodalton
LDL	Low Density Lipoprotein
Lys	Lysin
MIP-1 α	Macrophage Inflammatory Protein-1 α
mL	Milliliter
MMP	Matrix Metalloproteinase
p38 MAP-Kinase	p38 Mitogen-activated Protein-Kinase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCs	Proprotein Convertasen
PI-3 Kinase	Phosphoinositol-3 Kinase
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
TGN	<i>trans</i> -Golgi Netzwerk
TIMP	Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Val	Valin
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VSMC	vascular smooth muscle cell = glatte Gefäßmuskelzelle

9. Danksagung

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Philipp Stawowy, Leiter der Arbeitsgruppe experimentelle Kardiologie am Deutschen Herzzentrum Berlin, danke ich für die Vergabe des Themas, seine Betreuung, kontinuierliche Unterstützung und zahlreiche Hilfestellungen.

Mein Dank gilt auch Frau Dipl.-Ing. Heike Meyborg, die mich in allen labortechnischen Fragen unterstützte und mich durch ihre aufmunternde Art immer wieder motivierte. Ich danke Frau Dr. med. Vesna Furundzija und Herr Priv.-Doz. Dr. med. Kai Kappert, die mich bei meiner Arbeit im Labor bereitwillig unterstützten.

Abstract:

Fritzsche J, Kappert K, Furundzija V, Meyborg H, Graf K, Fleck E, Stawowy P. IGF-1 induces macrophage migration and foam cell formation. *Clin Res Cardiol.* 2009;98 (Suppl 1).

Publikationen:

1. Kappert K, Tsuprykov O, Kaufmann J, **Fritzsche J**, Ott I, Goebel M, Bähr IN, Hässle PL, Gust R, Fleck E, Unger T, Stawowy P, Kintscher U. Chronic treatment with losartan results in sufficient serum levels of the metabolite EXP3179 for PPARgamma activation. *Hypertension.* 2009;54:738-743.
2. Kappert K, Furundzija V, **Fritzsche J**, Margeta C, Krüger J, Meyborg H, Fleck E, Stawowy P. Integrin cleavage regulates bidirectional signalling in vascular smooth muscle cells. *Thromb Haemost.* 2010; 103:556-563.
3. Furundzija V*, **Fritzsche J***, Kaufmann J, Meyborg H, Fleck E, Kappert K, Stawowy P. IGF-1 increases macrophage motility via PKC/p38-dependent $\alpha v\beta 3$ -integrin inside-out signaling. *Biochem Biophys Res Comm.* 2010; 394: 786–791.

Selbstständigkeitserklärung

“Ich, Jan Fritzsche, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: “Die Bedeutung von Insulin-like Growth Factor-1 für die Integrin-vermittelte Migration von humanen THP-1/Makrophagen” selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dargestellt habe.”

Datum

Unterschrift