Universitätsklinikum Ulm,
Zentrum für Innere Medizin, Klinik für Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. Wolfgang Rottbauer

C-reaktives Protein und Arteriosklerose

-

Untersuchungen zur Proteinkinase-C-vermittelten CRP-Synthese in HepG2-Zellen und zur Rolle des Thrombins

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Marco Codagnone

geboren in Esslingen am Neckar

2015

Amtierender Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Oliver Zimmermann

2. Berichterstatter: PD Dr. med. Barbara Möpps

Tag der Promotion: 10.02.2017

Gewidmet meinen Eltern und meinem Bruder

In Liebe und Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1
1.1. Definition und Pathogenese der Arteriosklerose 1
1.1.1. Definition 1
1.1.2. Pathohistologie der Arteriosklerose 2
1.1.3. Pathogenese der Arteriosklerose 3
1.2. Capsel-reaktives Protein (CRP) 5
1.2.1. Allgemein 5
1.2.2. Synthese, Struktur und Funktion 7
1.3. Capsel-reaktives Protein und Arteriosklerose 8
1.4. Proteinkinase C (PKC) 10
1.5. Thrombin 13
1.6. RNA-Interferenz (iRNA) 15
1.7. Fragestellung 17

2 Material und Methoden 19
2.1. Zellkultur 19
2.1.1. Splitten von HepG2-ABEK14-Zellen 21
2.2. Transfektion mit small-interference RNA (siRNA) 22
2.3. Stimulation 23
2.3.1. Stimulation transfizierter und unbehandelter HepG2-ABEK-14 Zellen mit PDBu 23
2.3.2. Stimulation von HepG2-ABEK-14 Zellen mit Thrombin 23
2.4. Lyse 24
2.4.1. Lyse für den Luziferase-Assay 24
2.4.2. Lyse für den Western-Blot 24
2.5. Luziferase-Assay 25
2.6. Proteinassay 26
2.7. Gelelektrophorese 28
2.8. Western-Blot 30
2.9. Detektion der Proteine mit Antikörpern 31
2.10. Filmentwicklung 32
2.11. Stripping zur α-Tubulin Ladungskontrolle 33
2.12. Statistik 34

3 Ergebnisse 35
3.1. Capsel-reaktives Protein-Promoteraktivität in siRNA transfizierten HepG2-ABEK-14 Zellen 35
3.1.1. Knockdown der Proteinkinase C δ durch siRNA Transfektion – Bestimmung der Capsel-reaktives Protein-Promoteraktivität 36
3.1.2. Knockdown der Proteinkinase C ε durch siRNA Transfektion – Bestimmung der Capsel-reaktives Protein-Promoteraktivität 38
3.2. Capsel-reaktives Protein-Synthese in HepG2-ABEK14-Zellen nach Stimulation mit Thrombin 40

4 Diskussion 42
4.1. Capsel-reaktives Protein und Arteriosklerose 42
4.2. Diskussion des Versuchsmodells 46
4.3. Proteinkinase C δ/ε – Mögliche Angriffspunkte der Syntheseinhibierung 47
4.4. Thrombin, ein Stimulator der Capsel-reaktives Protein-Synthese? 49

5 Zusammenfassung 51

6 Literaturverzeichnis 53

7 Danksagung 72

8 Lebenslauf 73

Abkürzungsverzeichnis

A

Å	Ångström
AMP	Adenosinmonophosphat
aPKC	atypische Proteinkinase C
APP	Akute-Phase-Proteine
AS	Aminosäuren
ASO	Antisense oligonucleotid
ATP	Adenosintriphosphat

B

BCA	Bicinchinon-Säure
bp	Basenpaare

C

C/EBP	CCAAT-Box/ Enhancer-Binding-Protein
C5b-9	Komplementkomponenten C5b-C9, terminaler Membranangriffs-komplex
Ca^{2+}	Calcium-Ionen
CD	Cluster of Differentiation
CHAPS 3-	[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio] -l-Propansulfonsäure
cm	Zentimeter
cm^2	Quadratzentimeter
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CRP	Capsel-reaktives Protein
cPKC	konventionelle Proteinkinase C

D

DAG	Diacylglycerol
dd H_2O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure

E

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELDL	enzymatisch verändertes LDL
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthetase

F

Fc	Immunglobulinrezeptor
FCS	Fetal calf serum

G

g	Gramm
GPIb	Glykoprotein Ib

H

h	Stunde
H_2O	Wasser
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
H_2SO_4	Schwefelsäure
HBV	Hepatitis B Virus
HCL	Hydrogenchlorid
HDL	High Density Lipoprotein
HepG2	Hepatomzelllinie G2
HepG2-ABEK14	Hepatomzelllinie G2 mit einer stabilen Transfektion eines CRP Promoterkonstrukts und Luciferase Reportergens, Eigenname benannt nach den Mitarbeitern die diese Zelllinie generiert haben (Andrea Bucher, Elke Kessler)
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HNF	hepatocyte nuclear factors, lebertypische Transkriptionsfaktoren
HRP	Horse radish peroxid
hsCRP	high sensitivity CRP
HTS	High-Throughput-Screening

I

ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IFNγ	Interferon γ
IGF	Insulin-like growth factor
IgG	Immunglobulin G
IL-1	Interleukin 1
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Media
iRNA	RNA-Interferenz

K

kbp	kilo-Basenpaare
kDa	Kilodalton
KHK	koronare Herzkrankheit

L

l	Liter
LAE	Lungenarterienembolie
LDL	Low Density Lipoprotein
LF	Lipofectamin
LY33531	Bisindolylmalmeid-Derivat Ly33531

M

M	Molar
mA	Milliampere
MAK	Membran-Angriffskomplex
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MCSF	Monocyte Colony Stimulating Factor
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
Mg^{2+}	Magnesiumionen
Min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
MPS	Mononukleäres Phagozytierendes System
mRNA	messenger RNA

N

neg.	negativ
NET	Blockpuffer, enthält Leberextrakt
NFκB	nukleärer Faktor Kappa B
ng	Nanogramm
nm	Nanomol
NO	Stickstoffmonoxid
nPKC	neue Proteinkinase C
NT	non-treated (unbehandelt)

O

O_2	Sauerstoffmolekül
oxLDL	oxidiertes Low Density Lipoprotein

P

p	statistischer Signifikanzwert
p50	Untereinheit des nukleären Faktors kappa-B
p65	Untereinheit des nukleären Faktors kappa-B
PAR	Protease-aktivierte Rezeptoren
PAVK	Periphere Arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDBu	4α-Phorbol 12,13 Dibutyrat
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDK-1	phosphoinositide-dependent kinase-1
pGL3	Luciferase-Reporter Vektor
PHH	primäre humane Hepatozyten
PKC	Proteinkinase C
PKR	Proteinkinase R
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	Pyrophosphat
PS	Phosphatidylserin
PSG	Penicillin/Streptomycin/L-Glutamin

PTGS	posttranskriptionale Genblockade

R

RISC	RNA-induced silencing complex
RLU	relative light units
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNAse	RNA-spaltendes Enzym

S

siRNA	small interfering ribonuclein acid
SMC	smooth muscle cells
snRNA	small nuclear ribonuclein acid
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription

T

TGF-β	Transforming Growth Factor β
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TPA	Tetradecanoylphorbolacetat
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TVT	tiefe Beinvenenthrombose

U

U/min	Umdrehungen/Minute

V

VCAM -1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VEGF	vascular endothelial growth factor
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

W

WHO	World Health Organisation

Z

Zn^{2+}	Zinkionen

1 Einleitung

1.1. Definition und Pathogenese der Arteriosklerose

1.1.1. Definition

Die World Health Organization (WHO) definiert die Arteriosklerose als eine

„(…)variable combination of changes of the intima of arteries (as distinguished from arterioles) consisting of the focal accumulation of lipids, complex carbohydrates, blood and blood products, fibrous tissue and calcium deposits, and associated with medial changes." [172].

Die Arteriosklerose und ihre Folgeerkrankungen stellen weltweit laut des europäischen Gesundheitsberichtes der WHO von 2012 ca. 50% aller Todesfälle in der industrialisierten Welt dar [169]. Sie ist Ursache für Volkskrankheiten wie koronare Herzkrankheit (KHK), Schlaganfall, Niereninsuffizienz und periphere arterielle Verschlusskrankheit. Im Rahmen der Framingham-Studie, einer 1948 begonnenen epidemiologischen Studie einer Kleinstadt in den USA, konnten eine ganze Reihe von Risikofaktoren wie Hyperlipoproteinämie, Low Density Lipoprotein (LDL) - Überschuss, High Density Lipoprotein (HDL) - Mangel, ungesunde Ernährung, Bewegungsmangel, psychosoziale Faktoren, obstruktive Schlafapnoe, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Adipositas, Hyperuricämie und Rauchen nachgewiesen werden [28, 87]. Im Laufe der vergangenen Jahre kamen weit über 250 Risikofaktoren hinzu inklusive genetisch determinierter Ursachen wie Homozystinurie sowie Hyperlipoproteinämie Typ II / Typ IV [158].
Durch diese Risikofaktoren kommt es über viele Jahre hinweg zu den typischen Veränderungen der Gefäßwände und schließlich zur Manifestation einer Arteriosklerose [131, 132, 133].

1.1.2. Pathohistologie der Arteriosklerose

Die Atherosklerose stellt die wichtigste Unterform der Arteriosklerose dar, die die großen und mittleren Gefäße betrifft. Es kommt zur Verdickung, Verhärtung und Elastizitätsverlust der Gefäßwand. Diese Veränderungen führen letztlich zu einer Lumeneinengung und Strömungsbehinderung des Blutes.

Nomenklatur und Histologie	***Wachstums-mechanismus***	***Zeitliches Auftreten***	***Manifestation***
Typ I (initiale) Läsion: Einzelne Makrophagen mit Schaumzellbildung	Hauptsächlich Lipidakkumulation	Ab der ersten Dekade	Klinisch stumm
Typ II (fatty-streak) Läsion: Intrazelluläre Lipidakkumulation			
Typ III (Intermediäre) Läsion: wie Typ II Läsionen + kleine extrazelluläre Lipidpools		Ab der dritten Dekade	
Typ IV (atherome) Läsion: Wie Typ II Läsionen + große extrazelluläre Lipidkerne			Klinisch stumm oder Auftreten von Erkrankungen
Typ V (fibroatherome) Läsion: Lipidkerne, Fibrose, Verkalkung	Zunahme von glatter Muskulatur und Kollagen	Ab der vierten Dekade	
Typ VI (komplizierte) Läsion: Oberflächendefekte, Hämorrhagien, Hämatome, Thromben	Thrombose, Hämatome		

Abb. 1: Progression arterieller Läsionen und ihre histologische Klassifizierung nach Stary [133]. In der ersten Spalte wird die Stadieneinteilung nach Stary der arteriellen arteriosklerotischen Läsionen nach ihrem histologischen Verlauf (Typ I – VI) dargestellt. In der zweiten Spalte kann man sehen, dass es sich um einen progredienten Verlauf handelt, in dem es sukzessive im Laufe des Lebens (Spalte 4) bis zu einer komplizierten Läsion kommen kann mit z.B. Thrombenbildung und Hämatomen (Spalte 3). Hierbei kann das Stadium IV (atherome Läsion) direkt in das Stadium VI (komplizierte Läsion) übergehen. Ein Stadium VI (komplizierte Läsion) wiederum kann sich in ein Stadium V (fibroatheromatöse Läsion) zurückentwickeln, bzw. stabilisieren. Die ersten 3 Stadien laufen in der Regel unbemerkt ab (Spalte 5).

Die Arteriosklerose ist ein Prozess der bereits im frühesten Alter beginnt. Typ I Läsionen werden bereits bei Säuglingen gesehen und definieren sich über Ansammlungen von mit Lipiden beladenen Makrophagen in der Intima. Diese gehen in sogenannte Fettstreifen (fatty-streak-lesions) über (Typ II). Charakteristisch hierfür sind größere Ansammlungen lipidbeladener Zellen und vermehrtes Vorkommen von Makrophagen in der Intima. Finden sich extrazelluläre Lipide spricht man von Typ III-Läsionen. Hier ist die Anzahl der Makrophagen, glatten Muskelzellen und Lymphozyten nahezu identisch zu Typ II-Läsionen. Die extrazellulären Lipide nehmen Einfluss auf die Intimastruktur indem sie die extrazelluläre Matrix verdrängen und letztlich die glatten Muskelzellen auseinanderdrängen. In Typ-IV-Läsionen kumulieren die extrazellulären Lipide zu Lipidkernen. Es kommt zu einer Lumeneinengung und zum Fortschreiten der Umbauvorgänge mit Lipideinlagerungen der Intima. Kommen fibröse Komponenten hinzu werden die Läsionen als Typ-V-Läsionen bezeichnet. Hier werden 3 Arten je nach Zusammensetzung unterschieden:
Fibrosierte Läsionen mit…
…einem Lipidkern (Typ Va)
…Verkalkung (Typ Vb)
…sehr wenigen oder ohne Lipide (Typ Vc)
Durch einen Riss der fibrösen Kappe entstehen Typ VI-Läsionen. Hier unterscheidet man ebenfalls 3 Arten. Bei Typ VIa-Läsionen sieht man eine zerstörte Oberfläche. Kommt es zu Hämatomen oder Hämorrhagien durch Einblutungen liegt eine Typ VIb-Läsion vor. Bei thrombotischen Komplikationen spricht man von Typ VIc-Läsionen [133, 134].

1.1.3. Pathogenese der Arteriosklerose

Aufgrund der Komplexität der arteriosklerotischen Prozesse gab es im Laufe der Jahrzehnte verschiedenste Theorien zu ihrer Entstehung. Ribbert hatte 1905, aufgrund der Beobachtung einer aufgelockerten Intima, das „Eindrücken“ von Blutplasma in die Gefäßwand als Voraussetzung für die Entstehung der Arteriosklerose vermutet [110]. Anitschkow verdächtigte bereits 1913 die Lipide als verantwortlich für eine schädigende Wirkung auf die Gefäßwände [3]. Während zunächst häufig infektiöse Faktoren im Verdacht standen die Arteriosklerose zu

begünstigen [120] ist man sich heute weitestgehend darüber einig, dass eine endotheliale Dysfunktion verantwortlich zu sein scheint. Zu diesen Erkenntnissen haben die Arbeiten von Russel Ross (1929-1999) wesentlich beigetragen. Ross war in den 70er Jahren Professor für Pathologie an der Universität Washington, USA. Er veröffentlichte damals die Response-to-injury-Hypothese [118], in der er postulierte, dass es initial durch Endothelschäden im Gefäßbett zur Freisetzung von Mediatoren und Wachstumsfaktoren kommt. Stimuliert durch diese Zytokine erfolgen eine Proliferation glatter Muskelzellen und die Bildung fibröser Plaques, die schließlich zur Arteriosklerose führen. Diese Hypothese sollte Ross im Laufe der Jahre noch mehrfach anpassen (1986/1993/1999).

Heute geht man von einer endothelialen Dysfunktion, verursacht durch Risikofaktoren wie Übergewicht, Tabakkonsum, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie und hämodynamische Faktoren, als ursächlichen auslösenden Faktor aus [170]. Durch diese endotheliale Dysfunktion kommt es zu einer erhöhten Permeabilität der Gefäßwand für Lipide und Zytokine und somit zu Ansammlungen von Low-Density-Lipoproteinen in der Intima [55]. Parallel kommt es durch den Endothelzellstress zu einer Hochregulation von Genen wie zum Beispiel unter anderem für monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), platelet derived growth factor (PDGF) und Interleukin 8 (IL-8) welche die Monozyten- und T-Lymphozytenattraktion steigern können [129, 179]. Durch eine gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen wie P-Selectine, Integrine oder Adhäsionsmoleküle aus der Immunglobulinsuperfamilie, z.B. vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) [175] kommt es zur Bindung von Leukozyten an die Gefäßwand, die in arteriosklerotischen Läsionen vorwiegend durch Monozyten und T-Lymphozyten erfolgt. Die nun vorhandenen Monozyten in der Läsion werden durch Interleukin 1 (IL-1), Tumor Nekrose Faktor α (TNF-α) und monocyte colony stimulating factor (MCSF) in ihrer Umwandlung zu Makrophagen stimuliert. Die T-Lymphozyten werden durch Interleukin 2 (IL-2), TNF-α und andere Zytokine aktiviert und fördern bzw. unterhalten mit Interferon-γ (IFNγ) und TNF-α/β die Entzündungsprozesse. Die aktivierten Makrophagen scheiden im Verlauf weitere Zytokine wie TNF-α, IL-1, transforming growth factor β (TGF-β) aus, die wiederum neue Monozyten/Leukozyten anziehen. Makrophagen phagozytieren im nächsten Schritt die in der Gefäßwand gestrandeten oxidierten Lipoproteine über ihre Scavengerrezeptoren. Dadurch kommt es zur Bildung sogenannter Schaumzellen und

schließlich zum Zelltod [102]. Durch Wachstumsfaktoren wie z.B. PDGF, TGF-β, Insulin-like growth factor (IGF) kommt es zur Proliferation und Migration glatter Muskelzellen aus der Media in die Intima. Dort können die Muskelzellen ebenfalls über Ausbildung von Scavenger-Rezeptoren zu Schaumzellen werden und oxidierte Lipoproteine aufnehmen. Weiterhin produzieren sie eine extrazelluläre Matrix aus Kollagenen (Typ I, III, IV, V), elastischen Fasern und Proteoglykanen. Dies stabilisiert die Läsion und führt zur Fibrose. Durch hämodynamische Faktoren (sog. circumferential-tensile-stress) kommt es zu einer Druckbelastung auf den weichen Lipidkern der arteriosklerotischen Läsion und infolge mangelnder Absorption zur Weiterleitung an die fibröse Kappe. Hier entsteht typischerweise ein Riss in der Schulterregion der Läsion, d.h. an den lateralen Enden der Kappe. Durch die von Makrophagen produzierten Matrix-Metalloproteasen, Gelatinasen und Kathepsine kommt es zum Abbau stabiliserender Kollagene die durch Zellen glatter Muskulatur gebildet werden. Hieraus resultieren eine interne Destabilisierung der endothelialen Grundstruktur und schließlich Thromben bzw. der Verschluss des Gefäßes. Die Thromben entstehen oft auf dem Boden von Hämorrhagien in der Läsion, die von Mikrogefäße ausgehen. Deren Entstehung wird durch angiogenetische Wachstumsfaktoren wie vascular endothelial growth factor (VEGF) induziert. Produziert werden die VEGF wiederum durch Monozyten [62].

1.2. Capsel-reaktives Protein (CRP)

1.2.1. Allgemein

Erstmalig beschrieben wurde das C-reaktive Protein im Jahr 1930 von Tillet und Francis am Rockefeller Institut in New York, USA [145]. Sie entdeckten eine Substanz im Serum von Patienten, die an einer akuten Lobärpneumonie erkrankt waren und die die Eigenschaft hatte mit dem C-Fragment des Lipopolysaccharids von Pneumokokken zu präzipitieren.
Initial schrieb man ihr eine kausal pathologische Bedeutung zu, da es in Patienten mit Infekten und/oder Tumorerkrankungen zu finden war.

Im Rahmen einer Infektion, Trauma oder Gewebeschadens kann der Serumspiegel von CRP innerhalb von 24-48 h um das über 1000-fache seines Normwertes ansteigen [44]. Die Halbwertszeit des Proteins beträgt 19 Stunden. Diese Eigenschaften haben das CRP zu einem beliebten Serumparameter zur Verlaufsbeobachtung bzw. Screening von Infektionen in der täglichen klinischen Routine werden lassen.

Zur Messung von CRP und high sensitivity CRP (hsCRP), d.h. CRP-Werten unter den im klinischen Gebrauch häufigem Grenzwert für Infektionen von 5 mg/l, dienen hochsensitive Anti-CRP-Antikörper so dass mit Hilfe von Assays heute auch Konzentrationen von bis zu 0,02 mg/l präzise und zuverlässig gemessen werden können.

CRP gehört funktionell in die Gruppe der Akute-Phase-Proteine (APP). Per Definition steigen oder fallen die Plasmaspiegel der APP um mindestens 25% während eines entzündlichen Geschehens [95]. Proteine mit ansteigenden Werten zählen zu den positiven APP, solche mit sinkenden zu den negativen APP.

Tab. 1: Akute-Phase-Proteine und ihre Serumkonzentrationsänderung im Rahmen akuter Infekte nach Kaplan [58]. Positive Akute-Phase-Proteine steigen in ihrer Serumkonzentration an, negative Akute-Phase-Proteine fallen ab.

	Positive Akute-Phase-Proteine	Negative Akute-Phase-Proteine
Proteinase-Inhibitoren	Alpha1-Antitrypsin, Alpha1-Antichymotrypsin, Alpha2-Macroglobulin, Antithrombin	Inter Alpha-Antitrypsin
Gerinnungsfaktoren	Fibrinogen, Prothrombin, Factor VIII, Plasminogen	
Komplementfaktoren	C1s, C2, B, C3, C4, C5	Properdin
Transportproteine	Haptoglobin, Haemopexin, Caeruloplasmin	
Weitere Proteine	Capsel-reaktives Protein, Serum Amyloid A protein, Fibronektin	Albumin, Transthyretin, High Density Lipoprotein, Low Density Lipoprotein

1.2.2. Synthese, Struktur und Funktion

Das CRP ist ein vorwiegend in der Leber synthetisiertes Protein, das ebenso wie Serum Amyloid P component zur Gruppe der kurzen Pentraxine gehört. Weitere Syntheseorte, die aber nicht wesentlich die Serumspiegel beeinflussen, sind Lymphozyten [79, 98], Makrophagen [76], glatte Muskulatur (SMC) [19], arteriosklerotische Plaques [64], Nieren [64], Pankreasgewebe [39] und respiratorisches Epithel [49].

Synthese:

Reguliert wird die CRP-Synthese durch Zytokine, v.a. lL-1, IL-8 und IL-6 [44, 71, 82, 88, 142, 146, 180]. Transkriptionsfaktoren wie signal transducer and inductor 3 (STAT 3) und Mitglieder der CCAATbox/Enhancer Binding Protein-Familie (C/EBP, v.a. α/β/γ) sind an der IL-6 induzierten Kaskade beteiligt. Weiterhin zu nennen wären die lebertypischen Transkriptionsfaktoren hepatocyte nuclear factors (HNF) HNF-1α und HNF-3 [82, 146]. Des Weiteren sind die Untereinheiten p50/p65 des nukleären Faktors kB (NF-kB) im Signaltransuktionsweg der Zytokin vermittelten CRP-Synthese involviert [63].

Struktur:

Das CRP hat ein Molekulargewicht von 105 kiloDalton (kDa) und einen Außendurchmesser von 102Å mit einer zentralen Pore von 30Å. Strukturell liegt hier ein Pentamer aus nichtkovalent gebundenen identischen Polypeptideinheiten vor. Jede Untereinheit hat eine Masse von 23 kDa und besteht aus ca. 206 Aminosäuren (AS). Die Monomere besitzen eine Bindungsstelle für den Komplementfaktor C1q sowie Fcγ (A-Seite) und gegenüberliegend eine Calcium-abhängige (mit 2 Calcium-Ionen assozierte) Untereinheit zur Bindung von Phosphorylcholin, Histon, Chromatin und small nuclear ribonuclein acid (snRNA) (B-Seite) [33, 144, 165].

Funktion:

CRP ist in der Lage pathogene und beschädigte Zellen zu erkennen und deren Zerstörung zu veranlassen indem das Komplementsystem aktiviert und Phagozyten bereitgestellt werden. Bei beschädigten Zellhüllen stülpt sich die innere Membran nach außen (membran flip-flop) und das CRP interagiert in Anwesenheit von Lysolecithin mit Phosphocholin, d.h. mit den polaren Gruppen von Lecithin und Sphingomyelin [50]. Phosphocholin ist Bestandteil von Lipopolysacchariden,

membrangebundenen Kohlenhydraten sowie Teichonsäuren. Man findet sie in allen zellulären, tierischen und menschlichen Membranen, ebenso bei Pflanzen, Pilzen und Bakterien (z.B. im C-Polysaccharid der Streptokokken) [124, 141]. Durch mehrere gebundene CRP-Moleküle kommt es zur Bindung des C1q-Komplexes, Aktivierung der C3-Konvertase und folglich zur Aktivierung der klassischen Komplementkaskade [70, 166]. Weiterhin kann es zur Bildung des terminalen Komplementkomplexes C5b-9 kommen [68, 94]. Durch CRP kommt es zur Opsonierung der Fremdpartikel [164]. Die phagozytierenden Leukozyten und Makrophagen binden über FcγIIa-Rezeptoren, die unspezifische Immunglobulin G (IgG) - Rezeptoren der Leukozytenoberfläche darstellen, die CRP-markierte Struktur [89] und beginnen mit dem Abbau der Zelle.
CRP ist weiterhin in der Lage das Phosphocholin in nativem LDL zu binden [29, 43, 167]. Ebenso konnte dies für oxidiertes Phosphocholin in oxidiertem LDL (oxLDL) gezeigt werden [22, 161]. Diese Eigenschaft des CRP ist ein wichtiger Bestandteil in der Pathogenese der Arteriosklerose (siehe unten).

1.3. Capsel-reaktives Protein und Arteriosklerose

In den letzten drei Jahrzehnten haben sich viele Studien mit der Frage beschäftigt, ob CRP ein verlässlicher Prädiktor für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse sei. Dabei konnte mehrfach in großen epidemiologischen Studien bewiesen werden, dass erhöhte Serum-CRP-Werte mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, d.h. erhöhter kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität einhergehen [27, 56, 74, 83, 111, 113, 116]. So konnte u.a. die EPIC-Norfolk-Studie, eine prospektive Studie an gesunden Männern/Frauen, zeigen, dass CRP ein statistisch signifikanter Prädiktor für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse darstellt. Es handelt sich hierbei um das bereits erwähnte hsCRP, d.h. CRP-Werte die sich im Normbereich bewegen und nicht das z.B. im Rahmen von Infekten erhöhte klassische CRP. So zeigte sich eine Odds ratio von 1,66 (CI 1,31-2,12, $p<0,0001$) nach Adjustierung für klassische Risikofaktoren (nach dem Framingham risk score) für Patienten im oberen Drittel des CRP Normbereichs im Vergleich zu Probanden mit CRP Werten im unteren Normdrittel [11]. Ob CRP ein reiner Prädiktor oder auch pathogenetisch an der Atherosklerose beteiligt ist, ist Gegenstand der Forschung und noch nicht endgültig

geklärt. Für die Beteiligung des CRPs an der Pathogenese der Arteriosklerose spricht die Tatsache, dass CRP in allen Phasen der Atherogenese zu finden ist [109, 150, 152, 174]. Torzewski et al. konnten bereits in sehr frühen arteriosklerotischen Läsionen CRP diffus in der Intima, v.a. in der fibroelastischen und fibromuskulären Schicht [150], sowie eine Kolokalisation des CRPs mit aktiviertem Komplement in der Arterienwand nachweisen [152, 174]. Dies wird durch die Tatsache unterstützt, dass CRP in der Lage ist das Komplementsystem auf dem klassischen Weg zu aktivieren [164, 171]. Dabei scheint das Komplement eine entscheidende Rolle in der Pathogenese zu spielen [147, 153]. Bereits in geringen Konzentrationen führt der Membranangriffskomplex (MAK C5b-C9) zur Freisetzung von MCP-1 [77], ein Chemokin, dass die Monozyten/Makrophagen Migration und Infiltration reguliert [151]. CRP wiederum kann ebenfalls zu einer MCP-1 Sekretion führen [104]. Der MAK führt weiterhin zu einer Proliferation der SMC [101]. CRP selber verstärkt dies zudem durch eigene chemotaktische Wirkung auf Monozyten [150].

Ein weiterer Effekt des CRPs auf Endothelzellen ist die Herunterregulation der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthetase (eNOS) durch Hemmung ihrer Expression und Aktivität [162, 163]. Die eNOS katalysiert die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) aus L-Arginin. Das entstandene Stickstoffmonoxid wirkt vasoprotektiv über verschiedene Mechanismen. Unter anderem führt NO zu einer Vasodilatation und zu einer Hemmung der Proliferation der glatten Gefäßmuskulatur [20, 42]. Durch NO kommt es zu einer verminderten Anlagerung der Thrombozyten an das Endothel und Hemmung ihrer Aggregation [20, 42, 159].

Ein entscheidender Schritt der Atherosklerose ist die Schaumzellbildung in den Läsionen. 1979 zeigte Goldstein, dass chemisch modifizierte Produkte des LDL nach Aufnahme durch Makrophagen zu einer Schaumzellbildung führten [15, 16]. LDL findet sich bereits in frühen Läsionen [150]. Inzwischen weiß man, dass die Aufnahme rezeptorvermittelt über sog. Scavengerrezeptoren [16, 17, 53] und wahrscheinlich auch ohne Rezeptor, z.B. durch Makropinozytose, stattfindet [78]. Scavenger-Rezeptoren können im Gegensatz zu klassischen LDL-Rezeptoren nicht herunterreguliert werden, so dass es zu einem Absterben der Zelle kommt [150]. Die Aufnahme von oxLDL erfolgt alternativ über Fc-Rezeptoren (Immunglobulinrezeptoren) [126]. Bei der Aufnahme scheint CRP eine tragende Rolle zu spielen. So konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme des LDL in Anwesenheit von

CRP ansteigt wobei die Aufnahme der LDL/CRP-Komplexe Fcγ-Rezeptor-vermittelt erfolgen kann [181]. CRP ist in der Lage modifiziertes und nicht modifiziertes LDL zu binden [22, 29] und findet sich bemerkenswerterweise signifikant und fast ausschließlich mit Makrophagen assoziert in arteriosklerotischen Läsionen [150]. Die Bindung des CRP an LDL erfolgt calciumabhängig [29, 108, 119]. Bei den enzymatisch veränderten LDL (ELDL) werden Bindungsstellen durch enzymatische Degradation frei und führen zur Aufnahme [7, 8, 148]. Auch bei oxidiertem LDL wird eine Phosphorylcholinbindungsstelle frei [22, 161]. CRP bindet und interagiert über Fcγ-Rezeptoren mit den Makrophagen [9, 89, 136].

Zusammenfassend kann postuliert werden, dass CRP über Komplement- und Makrophageninteraktion Einfluss auf die Arteriosklerose zu nehmen scheint. Weitere Mechanismen durch die CRP Einfluss nimmt, aber auf die nicht weiter eingegangen werden soll, sind die CRP induzierte Expression intrazellulärer Adhäsionsmoleküle wie intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), VCAM-1 und E-Selektin in Endothelzellen [105], die CRP stimulierte Superoxide-Anionen Freisetzung sowie die tissue-factor Aktivität in vivo [31].

Gegen die Beteiligung des CRPs an der Arteriosklerose sprechen diverse Mendel-Randomisierungs-Studien. Hier konnte kein Zusammenhang gezeigt werden [18, 37]. Methodische Einschränkungen der Mendel-Randomisierungs-Studien müssen jedoch in Betracht gezogen werden [128]. Van den Berg et al. vermuteten in ihren Arbeiten 2004 und 2005 Artefakte als Ursache der Wirkung des CRPs auf die Gefäßwände und gingen von keiner kausalen Beteiligung aus [143, 160]. Die veröffentlichten Studien wurden allerdings in vitro durchgeführt. Auf Grund der o.g. komplexen Interaktionen in vivo, sind die Ergebnisse von van den Berg et al. sehr kritisch zu sehen.

1.4. Proteinkinase C (PKC)

Der PKC-pathway ist an der CRP Synthese in primären humanen Hepatozyten (PHH) und in der Hepatomzelllinie G2-ABEK14-Zellen (HepG2-ABEK14) involviert [63]. HepG2-ABEK14-Zellen sind eine stabil mit einem 1kbp CRP Promotorkonstrukt und dem Luciferase Gen transfizierte Hepatoma-Zelllinie (siehe Material und Methoden). Diese Zelllinie eignet sich hervorragend aufgrund ihrer Stabilität und großen

Verfügbarkeit, um in Hochdurchssatz-Screenings (High-Throughput-Screening, HTS) die CRP-Synthese zu untersuchen.

Synthese/Struktur/Eigenschaften

1977 wurde die Protein Kinase C zunächst als protease-aktivierte Histon-Proteinkinase bezeichnet [61]. In den 1980er konnte man zeigen, dass die Kinase durch Phosphatidylserin und Calcium-Ionen (Ca^{2+}) aktiviert und durch Phorbolester stimuliert werden kann [21]. Heute weiß man, dass die Familie der PKC zu den ubiquitären Serin/Threonin – Kinasen gehört und in vielfältige Signaltransduktionsprozesse involviert ist. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Regulation vieler Zellprozesse wie Differenzierung, Wachstum, Protein-/Enzymsynthese und auch bei der Regulation kritischer Zellübergänge wie z.B. im Zellzyklus [10]. Es sind inzwischen mehr als 10 Isoformen der PKC bekannt die sich hinsichtlich Struktur, Gewebsverteilung, Substratspezifität, Lokalisation und biochemischen Eigenschaften unterscheiden. Eingeteilt werden die Isoformen aufgrund ihrer Aktivierungsmechanismen in 3 Gruppen. Die conventional PKCs (cPKC) beinhalten die Isotypen α, β1, β2, γ. Die Isoformen β1 und β2 stellen hier Spleißvarianten dar [26]. Alle cPKC werden durch Calcium, Diacylglycerol (DAG) oder Tetradecanoylphorbolacetat (TPA), sowie in Anwesenheit von sauren Lipiden wie Phospatidylserin (PS) aktiviert. TPA gehört zur Familie der Phorbolester und zeigt aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu DAG eine ähnliche Wirkung in Bezug zu PKC wie DAG. Die novel PKC (nPKC) δ, ε, θ, η benötigen DAG und saure Lipide, wohingegen die atypical PKC (aPKC) ζ, Λ, ι allein durch saure Lipide aktiviert werden können.

Alle Proteinkinasen bestehen aus einer c-terminalen katalytischen Region (ca. 45 kDa) und einer regulatorischen n-terminalen Untereinheit (ca. 20-70 kDa) [100]. Eine flexible hinge-Region verbindet beide Untereinheiten miteinander. Hier findet bevorzugt Proteolyse, durch Trypsin oder Calpain, statt. Insgesamt finden sich vier konservierte (C1-C4) und fünf variable Regionen (V1-V5). Die katalytische Untereinheit besteht aus der C3-Untereinheit, in der das für die Phosphorylierung notwendige Adenosintriphosphat (ATP) gebunden wird [23] und der C4-Untereinheit, in der das Substrat gebunden und das Phosphat übertragen wird. Die regulatorische Domäne besteht bei den PKCs aus einer Pseudosubstratregion, die sich im inaktiven

Zustand des Enzyms an das Zentrum der katalytischen Domäne legt, einer C1-Domäne mit zwei sich wiederholenden Zinkfingermotiven, in der DAG oder Phorbolester bindet (cPKCs und nPKCs). Am C2-Segment bindet bei den cPKC Ca^{2+} und saure Phospholipide, bei den nPKC hat sie keine Bindungspartner. Bei den aPKC ist die C2-Region nicht vorhanden.
Damit die Proteinkinasen in ihre aktive Form übergehen und zum Wirkort gelangen können sind mehrere Phosphorylierungsschritte notwendig. Am Beispiel der PKCε soll dies dargelegt werden. In einem ersten Schritt erfolgt die Phosphorylierung an einem Threoninrest (Thr566) im activation loop durch die upstream kinase phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK-1) [23, 34, 80]. Dies führt zum Beginn einer Folge von Autophosphorylierungen am c-terminalen Ende. Am turn motif (Thr710) kommt es durch bisher noch unbekannte Mechanismen zur Phosphorylierung und dadurch Aktivierung der Funktion der enzymatischen Eigenschaften der PKC. Anschließend folgt die Autophosphorylierung am hydrophobic motif (Ser729) die wichtig für die subzelluläre Lokalisation und Stabilität der PKC ist [5]. Die Konformationsänderungen und Translokalisationen unterscheiden sich erheblich bei den 11 Isoformen. Auch die Verteilung bzw. das Muster unterliegt je nach Zell- und Gewebsart großer Variabiltät.

Wie oben beschrieben können die PKC durch Phorbolester aktiviert werden. In folgenden Versuchen wurde 4α-Phorbol 12,13 Dibutyrat (PDBu) zur Stimulation der CRP-Synthese verwendet. Ivashchenko et al. zeigten 2005, dass durch Stimulierung mit PDBu die Transkription und Synthese von CRP gesteigert wird. Dies wird über Aktivierung der PKC durch PDBu erzielt. Durch das PDBu kommt es zu einer Phosphorylierung von Serin 105 innerhalb der Aktivierungsdomäne von C/EBPb, was zu einer Steigerung der transkriptionellen Aktivität führt und dadurch eine Erhöhung der CRP-Syntheserate in PHH zur Folge hat [63]. Weiterhin konnte eine Beteiligung der NF-κB-Kaskade in der PKC vermittelten CRP-Synthese gezeigt werden.
PDBu gehört zu der Familie der Phorbolester und wird synthetisch hergestellt. Es ist ein starker Aktivator der PKC und fördert die Bildung von NO [2, 60, 173].

1.5. Thrombin

In dieser Arbeit sollte untersucht werden inwieweit Thrombin als möglicher Angriffspunkt für die CRP-Synthese in Frage kommt. Vergleichbar mit CRP steigt bei Infekten der Thrombin-Serumspiegel stark an [180]. Weiterhin ist bekannt, dass sich auf Leberzellen Thrombinrezeptoren befinden, was zu der Annahme führen kann, dass Thrombin einen möglichen Induktor der CRP-Synthese darstellt [63]. Thrombininhibitoren sind seit langem kommerziell verfügbar und im klinischen Einsatz. Unterteilt werden sie in direkte und indirekte Thrombininhibitoren. Zu den bekannten, direkt hemmenden Substanzen zählen z.B. die peptidischen Thrombininhibitoren wie das Bivalirudin, dass auf Basis des Hirudin entwickelt wurde und Anwendung in der perkutanen Koronarintervention findet [90]. Hirudin wurde bereits 1894 von Haycroft als eine antikoagulatorisch wirksame Substanz im Speichelsekret des Blutegels Hirudo medicinalis beschrieben [57]. Zu den nicht-peptidischen Thrombininhibitoren gehören als bekannteste Vertreter das Dabigatran sowie das Argatroban. Argatroban wird in der Therapie der Heparin induzierten Thrombozytopenie eingesetzt [81]. Das oral verfügbare Dabigatran ist zugelassen zur Prävention von Schlaganfällen und systemischen Embolien bei Erwachsenen mit nichtvalvulärem Vorhofflimmern und einem oder mehreren Risikofaktoren (z.B. arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus), zur Primärprävention von venösen Thrombembolien bei Erwachsenen nach elektiven Hüft- oder Gelenkersatz und zur Therapie tiefer Beinvenenthrombosen (TVT) und Lungenembolien (LAE) sowie zur Rezidivprophylaxe von TVT und LAE, Thromboseprophylaxe bei Hüft- und Knieeingriffen, zur Therapie von Thrombembolien und zur Schlaganfallprophylaxe bei Vorhofflimmern [176]. Heparin stellt den bekanntesten indirekten Thrombininhibitor dar. Heparin wirkt unter anderem über die Bindung an Antithrombin und dadurch verursachte verstärkte hemmende Wirkung des Antithrombins an Thrombin. Es bestehen, wie gezeigt, eine große Auswahl an Thrombininhibitoren die zur Hemmung des Thrombins und evtl. der CRP-Synthese zur Verfügung stehen würden.

Synthese/Struktur/Eigenschaften

Thrombin gehört zur Gruppe der Serinproteasen, das codierende Gen F2 liegt auf Chromosom 11. Die Vorstufe von Thrombin, Prothrombin, wird in der Leber gebildet und kontinuierlich in das Blut abgegeben.

Die inaktive Vorstufe Prothrombin (579 AS) wird bei Aktivierung der Gerinnungskaskade durch Proteolyse in seine aktive Form (295 AS) gebracht. Die Spaltung des Prothrombins erfolgt calciumvermittelt in Form eines Prothrombinase-Komplexes bestehend aus den Gerinnungsfaktoren II, Va, Xa. Am bekanntesten ist Thrombin für die Eigenschaften, Fibrinogen zu Fibrin zu spalten und die Aktivierung der Faktoren V, VII, VIII, XIII sowie Protein C in der Gerinnungskaskade. Thrombin beeinflusst neben der Gerinnungskaskade auch die Freisetzung diverser Substanzen wie z.B. Serotonin, Wachstumsfaktoren, Chemokine und hat Einfluss auf die Thromboxansynthese und –freisetzung [14, 52]. Es findet durch Thrombin eine Aktivierung der Thrombozyten [13] und Proliferation/Migration von glatten Muskelzellen statt [99]. Vermittelt werden diese Effekte an diesen Zellen über die Bindung an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor der wiederum zur Familie der Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR) gehört. Gegenwärtig sind 4 PAR-Subtypen bekannt wobei PAR-1, PAR-3 und PAR-4 Thrombinrezeptoren darstellen und PAR-2 durch Trypsin aktiviert wird [59]. Diese Rezeptoren finden sich auf vielen unterschiedlichen Geweben, so dass ihre Funktion nicht nur auf die Proteolyse der Plasmaproteine im Rahmen der Gerinnung beschränkt ist. PAR-1 und PAR-4-Rezeptoren werden von Thrombozyten exprimiert, wobei PAR-1 insgesamt überwiegt [25]. In neueren Studien wird das Glykoprotein Ib (GPIb) als weiterer Rezeptor für Thrombin vermutet, so dass eine Aktivierung von PAR-1 und GPIb als Voraussetzung für eine komplette Aktivierung der Thrombin vermittelten Wirkungen in Thrombozyten postuliert wird [32, 85].

Der Aktivierungsmechanismus soll hier am Beispiel der PAR1 erläutert werden:

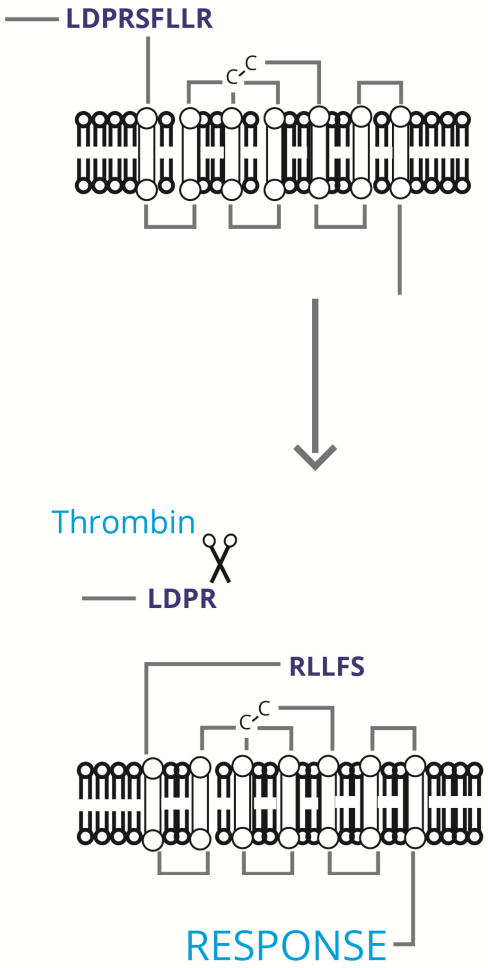


Abb. 2: Schematische Darstellung der Aktivierung des Proteinase-aktivierten Rezeptors 1 nach Hollenberg [59].
Durch Thrombin kommt es zur proteolytischen Spaltung am n-terminalen Ende. Es entsteht ein neues Ende mit der Sequenz SFLLRN, der sog. „tethered ligand". Diese Sequenz bindet intramolekular an den Rezeptor und aktiviert ihn. Durch diese Selbstaktivierung kommt es über Kopplung an regulatorische G-Proteine zur intrazellulären Signalweiterleitung [164, 170].

1.6. RNA-Interferenz (iRNA)

Durch die Methode der RNA-Interferenz (RNAi) ist es möglich gezielt einzelne Gene in Zellen auszuschalten (knockdown). 1998 wurde dieser Mechanismus von Andrew Fire und Craig Mello bei Untersuchungen an Fadenwürmern (Caernorhabditis elegans) als posttranskriptionale Genblockade (PTGS) beschrieben. Durch Einbringen

von doppelsträngiger Ribonukleinsäure (dsRNA) in den Wurm kam es zu einer Degradation sequenzkomplementärer messenger RNA (mRNA) und somit zu einem Knockdown [41]. Die PTGS wurde zuvor bereits an Pflanzen [67] und Pilzen [117] beobachtet.

Bei diesem zellulären Prozess wird doppelsträngige RNA in die Zellen eingebracht. Das kann sowohl von außen geschehen im Rahmen von Experimenten, als auch auf natürlichem Weg ablaufen. Man vermutet, dass RNAi eine wichtige Rolle im Schutzsystem der Zellen spielt. So dient dieser Mechanismus unter anderem der Kontrolle der Expression fremder Gene von z.B. Viren [91, 155]. Inzwischen sind weitere Klassen kurzer, regulatorischer RNAs wie z.B. die micro-RNA [40], Piwi-interacting RNA [4] und endogene siRNA [140, 168] gefunden worden.

Wirkung der RNAi

Zunächst kommt es in der Zelle durch das ATP-abhängige Enzym Dicer zu einer Spaltung der dsRNA in viele kurze Fragmente mit Basenlängen von ca. 20-25bp, die small interfering RNA (siRNA) [36, 178]. Das Dicer gehört zu den Enzymen der RNase III Familie und spaltet die dsRNA nach folgendem typischen Muster: Es entsteht siRNA mit Phosphatresten am 5´-Ende, eine 19 Nukleotide lange Doppelstrang-Region und zwei unpaare Nukleotide am unphosphorylierten 3´-Ende [35]. Die entstandene siRNA bindet anschließend an den Multienzym-Komplex RNA-induced silencing complex (RISC). Der RISC verfügt über eine Helikase, Exo- und Endonuklease sowie über eine Homologie-suchende Domäne [121]. Durch die Helikase findet ATP-abhängig eine Entwindung der siRNA statt [100]. Im nächsten Schritt erfolgt eine Zerstörung des Sense-Strangs der siRNA. Somit bleibt der passende Anti-Sense-Strang für die Ziel-messenger-RNA (mRNA) übrig. Der an den RISC gebundene Anti-Sense-Strang bindet nun die mRNA. Schließlich kommt es durch die Nuklease-Untereinheit zum Zerschneiden der mRNA und deren Funktionslosigkeit. Die Fragmente werden im Zytoplasma durch zelleigene RNasen abgebaut [1].

In experimentellen Zellversuchen wird siRNA durch z.B. lipidvermittelte Transfektion, Mikroinjektion oder Elektroporation direkt in die Zellen eingeschleust [35]. Gründe hierfür stellen folgende Mechanismen dar: Ein Einbringen von reiner dsRNA führt in Säugetierzellen zu einer Induktion der Interferon-Synthese. Das freigesetzte IFN induziert die 2´,5´-Oligoadenylat-Synthetase und über eine Aktivierung von Ribonuklease L kommt es zur Degradation von mRNA. IFN aktiviert weiterhin die

Proteinkinase R (PKR). PKR führt über Phosphorylierung des Translationsfaktors elF2α zu einer Hemmung der mRNA-Translation [130]. Dieser Vorgang findet ab einer Basenlänge von ca. 30 bp statt.

Für therapeutische Zwecke wie z.B. die Behandlung von viralen Infekten oder auch Krebs ist die iRNA-Methode von großem Interesse [12, 125]. So konnte bereits 2002 gezeigt werden, dass durch iRNA die Hepatitis B Virus- (HBV) und humanes Immundefizienz Virus- (HIV) Replikation im Zellkulturmodell inhibiert wird [24, 123]. Aktuell befinden sich mehrere Medikamente auf siRNA-Basis in klinischer Erprobung mit vielversprechenden Ergebnissen [69, 135], zugelassen wurde jedoch bisher noch keines. Ein Medikament dass ebenfalls gezielt Gene ausschalten kann und zur Gruppe der RNA-Therapeutika gehört ist Mipomersen. Das Medikament gehört zur Gruppe der ASO (antisense oligonucleotid) und wurde im Januar 2013 in den USA zugelassen. Durch einen komplementären RNA-Strang zur Ziel-mRNA wird die Translation des Proteins blockiert indem die mRNA abgebaut wird. So hemmt Mipomersen die Bildung von Apolipoprotein B und senkt den Cholesterinspiegel [135]. Zugelassen ist es in den USA für die Behandlung der homozygoten familiären Hypercholesterinämie [45].

1.7. Fragestellung

Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass erhöhte hsCRP-Spiegel mit einem erhöhten kardiovaskulären Erkrankungsrisiko einhergehen. Hierbei handelt es sich um CRP-Werte die im oberen Normbereich liegen und nicht um die im Rahmen von z.B. bakteriellen Infektionen deutlich erhöhten CRP-Werten. Ob eine kausale Beteiligung des CRPs bei der Entstehung der Arteriosklerose besteht konnte noch nicht endgültig geklärt werden. Die Inhibierung der CRP-Synthese stellt möglicherweise einen vielversprechenden Präventionsansatz bzw. eine mögliche Therapieoption bei arteriosklerotischen Erkrankungen dar. Außerdem könnte so auch die Frage einer kausalen Beteiligung des CRP in der Arteriosklerose untersucht werden. Sollte ein erniedrigter CRP-Wert zu einem Rückgang des Auftretens von Arteriosklerose, pAVK, KHK etc. auftreten, wäre dies ein Hinweis auf eine kausale Beteiligung.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Isoenzyme der Proteinkinase C, hier PKC δ und ε, an der CRP-Synthese beteiligt sind um über ihre Hemmung die CRP-Synthese zu senken. Es ist bekannt, dass die PKC an der Synthese des CRPs in humanen Hepatozyten beteiligt ist [63]. In unserer Arbeitsgruppe konnten die PKC-Isoformen α, β_1, β_2, γ, δ und ε in PHH nachgewiesen werden. Weiterhin konnte für PKC β_1 eine Beteiligung an der CRP-Synthese in HepG2-ABEK14-Zellen gezeigt werden. PKC α scheint nicht beteiligt zu sein [97].
Bei Identifikation einer möglichen Involvierung der PKC-Isoenzyme an der CRP-Synthese könnte über weitere Studien, z.B. durch Hemmung der PKC-Isoenzyme in vivo, die Frage der Rolle des CRPs an der Genese der Arteriosklerose weiter untersucht werden.

Fragestellung:

1. Sind die PKC-Isoenzyme δ und ε an der CRP-Synthese beteiligt?

2. Ist eine Inhibition ihrer Aktivität durch die Methode der RNA-Interferenz möglich?
Für diese Fragestellungen soll ein Knockdown der PKC-Isoformen durch Einschleusen von siRNA in die mit einem CRP-Promotor/Luciferase-Konstrukt stabil transfizierten HepG2-ABEK14-Zellen erfolgen.

3. Thrombin, ein Aktivator der CRP-Synthese?
Weiterhin soll untersucht werden ob Thrombin einen möglichen physiologischen Aktivator der CRP-Synthese darstellt. Der Thrombinspiegel im Serum steigt bei Infekten, analog zum CRP, stark an. Eine Beteiligung an der CRP-Synthese erscheint möglich. Da es kommerziell verfügbare Thrombininhibitoren gibt, könnte dies einen einfachen therapeutischen Ansatz zur CRP-Synthesehemmung darstellen.

2 Material und Methoden

Übersicht Versuchsaufbau

Ausplattieren der Zellen

↓24h

Transfektion mit siRNA

↓72h

Stimulation der Proteinkinase C Synthese mit PDBu

↓24h

Herstellen von Proteinvolllysaten der Zellen und Durchführen von Western-Blot und Luziferase Assay

Abb. 3: Flussdiagramm mit Darstellung des zeitlichen Versuchsablaufs

h = Stunden, PDBu = 4α-Phorbol 12,13-Dibutyrate, siRNA = small interfering Ribonukleinsäure

2.1. Zellkultur

HepG2-ABEK14 Zellen

Die kultivierbaren Leberzellen (PHH und Hepatomzellen) sind sehr teuer und aufwendig in der Anschaffung, da sie von Verstorbenen gewonnen werden müssen. Zudem produzieren sie nur sehr wenig CRP. Eine Messung durch die verfügbaren CRP-Enzyme-linked-Immunosorbent-Assays (CRP-ELISAs) ist so nicht möglich. Aus diesem Grund wurden in der Dissertation für die Versuche die Zelllinie HepG2-ABEK14 verwendet. Die Zelllinie wurde von unserer Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit der Sanofi Aventis Group hergestellt und erstmalig 2004 vorgestellt [63]. Bei der Zelllinie handelt es sich um die Hepatoma-Zelllinie HepG2 aus der deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, die zusätzlich stabil mit einem 1kbp CRP Promotorkonstrukt und dem Luciferase Gen transfiziert wurde.

Hierdurch wurde es möglich, Veränderungen der CRP-Promoteraktivität einfach und schnell durch Luziferase-Assay-Messungen zu erfassen und zu dokumentieren [38, 63].

HepG2 Zellen wurden aus einem gut differenziertem hepatozellulären Karzinoms eines elfjährigen argentinischen Jungen isoliert. Die Zellen sind sehr gut kultivierbar und sezernieren eine Vielzahl an Proteinen (Albumin, Transferrin, α2-macroglobulin,…), was sie zu der am häufigsten genutzten Zelllinie macht um Zytokin induzierte Syntheseprozesse der Leber zu untersuchen. Für die folgenden Versuche entscheidend, ist die Eigenschaft CRP zu produzieren [138].

Ablauf der Herstellung der Zelllinie HepG2-ABEK14 [63]:

Transfektion der HepG2 Zelllinie:

Es wurde zunächst ein Teil des CRP-Promoters (-1005 to +12 bp) aus dem humanen Genom kloniert.

Forward primer: 5´-ATGGTACCGTAAGATTGACAGACAGTGTGGAG-3`
Reverse primer: 5´-ATCTCGAGGGCTAGAAGTCCTAGATCTCTTGC-3`

Nach Amplifikation dieses Abschnittes mit Hilfe der PCR wurde das Produkt mit dem Restriktionsenzym Kpn-Xhol geschnitten, in den pGL3-BasicVector (Promega, Mannheim, Deutschland) kloniert und sequenziert. In einem weiteren Schritt erfolgte die Cotransfektion mit dem p1000/CRP/Luciferase-Konstrukt und pcDNA 3.1 durch Lipofectamine 2000 (LF2000; Invitrogen). Um Verunreinigungen durch andere Zellen zu vermeiden wurde den Zellen anschließend Standardmedium mit 1mg/ml G418 (Invitrogen) zugegeben, da HepG2-Zellen eine Resistenz gegenüber G418 aufweisen. G418 blockiert die Proteinsynthese in Säugetierzellen durch Interaktion mit den Ribosomen. Nach 18 Tagen konnten die ersten Klone isoliert werden, wobei der Klon HepG2-ABEK14 (Eigenname, bestehend aus (1) der Hepatom-Zelllinie HepG2 (2) den Namen, der für die Zelllinie verantwortlichen Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe und der Sanofi Aventis Group: Andrea Bucher und Elke Kessler sowie (3) der Klonnummer 14) für weitere Versuche ausgewählt wurde. Die Monolayerkultur wurde bei einer Temperatur von 37°C und einer Atmosphäre mit einem Anteil von 5% CO_2 inkubiert.

2.1.1. Splitten von HepG2-ABEK14-Zellen

Drei Mal wöchentlich erfolgte ein Mediumwechsel der Zellen, einmal die Woche die Passagierung mit Trypsin/ Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) wenn eine 70-80%ige Konfluenz der Zellen erreicht war. Die Zellen wurden in Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM, Kulturmedium), angereichert mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), 1% Penicillin/Streptomycin und 1% L-Glutamin in Kollagen-I beschichteten Kulturflaschen kultiviert. Dazu mussten eine Stunde vor Ausplattieren der Zellen die T-75 Flaschen bzw. 24 Well-Platten für eine Stunde mit 5µg/cm^2 Kollagen-I beschichtet und anschließend der Überstand bei Raumtemperatur unter einer LaminAir-Arbeitsbank abgesaugt werden. Auf Kollagen-beschichteten Oberflächen wird die Adhäsion der Zellen gesteigert. Zu Beginn der Passagierung wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 5 ml Dulbecco's PBS gewaschen und anschließend mit 4 ml Trypsin/EDTA abgelöst (Dauer ca. 5 min). Nach Zentrifugation (1200rpm, 5min, 20° C) zur Trennung der Zellen vom Überstand, wurden die Zellen in IMDM Kulturmedium resuspendiert, mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und mit einer Dichte von 100.000 Zellen pro ml Suspension wieder ausgesät (10 ml/T-75 Flasche). Für die Versuche wurden die Zellen auf 24 Well-Platten mit einer Dichte von 60.000 Zellen pro Well ausplattiert.

Materialien

-24-well Kulturplatte	(Becton Dickinson, Heidelberg, D)
-Kulturflaschen	(Becton Dickinson, Heidelberg, D)
-Eppendorf Reaktionsgefäße	(Eppendorf, Hamburg, D)

Geräte

-Brutschrank: HeraCell	(Heraeus, Hanau, D)
-Zentrifuge: Multifuge 1 S-R	(Heraeus, Hanau, D)
-Lamin Air	(Heraeus, Hanau, D)
-Neubauer Zählkammer	(Madaus AG, Köln, D)

Reagenzien

- IMDM without L-Glutamine	(PAA Laboratories GmbH, Linz, A)
-fetales Kälberserum (FCS)	(FisherScientific, Waltham, Massachusetts, USA)
-Penicillin/Streptomycin/Glutamin	(Invitrogen/GIBCO, Groningen, NL)

-L-Glutamine (200 MM)	(Invitrogen/GIBCO, Groningen, NL)
-Collagen Type I Rat Tail	(BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA)
-Trypsin-EDTA (1x)	(PAA Laboratories GmbH, Linz, A)
-Dulbecco´s PBS (1x) with Ca & Mg	(PAA Laboratories GmbH, Linz, A)

2.2. Transfektion mit small-interference RNA (siRNA)

Zur Transfektion der Zelllinie wurde die Technologie der small-interference RNA gewählt. Durch die 21 bis 28 Nukleotid langen RNAs besteht die Möglichkeit spezifisch Zielgene in den Zellen auszuschalten. Die siRNAs werden nach Einschleusung in die Zelle (entweder per Elektroporation oder Zuhilfenahme liposomaler Formulierungen) in einen Proteinkomplex namens RISC eingebaut. Mit ihrer Hilfe bindet dieser Komplex komplementär an die entsprechende DNA oder RNA. In der Folge kommt es zum Abbau der DNA/RNA und zum Erliegen der Proteinproduktion. Beobachtet werden kann dieses Phänomen in eukaryoten Zellen, die sich dieser Methode bedienen um zum Beispiel viraler Invasion entgegenzutreten.
Zur Vorbereitung wurden die HepG2-ABEK14-Zellen am Vortag in 24 Well-Platten mit einer Dichte von 60.000/Well ausgesät und in 10% FCS-, 1% Penicillin/Streptomycin/L-Glutamin (PSG) –angereichertem IMDM-Medium (insg. 10 ml) kultiviert. Nach 24 Stunden wurde den subkonfluenten Zellen (ca. 60%), nach zweimaligem Waschen mit jeweils 1 ml PBS, das fertige Transektionsreagenz hinzugegeben. Die Versuche in dieser Arbeit erfolgten mit der Methode der liposomalen Formulierung. Das Transfektionsreagenz wurde wie folgt vorbereitet:
Zunächst wurden die zwei Reagenzien Oligofectamin und OptiMEM (FCS-freies Medium) auf 37°C erwärmt und im Verhältnis 1 zu 4 (2,5 ml + 10 ml) gemischt. Anschließend wurden die siRNA Stammlösungen bzw. die Negative Control siRNA für fünf Minuten in den entsprechenden Konzentrationen (100nm) in je 40 µl OptiMEM-Medium gelöst und inkubiert. Nach der Inkubation wurde für weitere 20 Minuten mit 10 µl des vorbereiteten Transfektionsreagenz-Gemisches (OptiMEM und Oligofectamin) erneut inkubiert. Nach Zugabe von weiteren 200 µl OptiMEM wurde das fertige Transfektionsreagenz auf die Zellen gegeben.
Die Zugabe von 10 ml 30%FCS-haltigem IMDM-Medium erfolgte nach vier Stunden.

Reagenzien

-OptiMEM® I	(Invitrogen/GIBCO, Groningen, NL)
-Oligofectamin Reagent	(Invitrogen/GIBCO, Groningen, NL)
-Stealth™ Select RNAi HSS108497 (PRKCδ)	(Invitrogen/GIBCO, Groningen, NL)
-HP Validated siRNA 1027400 (PRKCε)	(Qiagen, Hilden, D)
-Stealth™ RNAi Negative Control Med GC	(Invitrogen/GIBCO, Groningen, NL)

2.3. Stimulation

2.3.1. Stimulation transfizierter und unbehandelter HepG2-ABEK-14 Zellen mit PDBu

Die transfizierten Zellen (ungefähr 80-90% Konfluenz) wurden mit 100 nM PDBu, gelöst in Kultivierungsmedium, versetzt und für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Durch den synthetisch hergestellten Phorbolester PDBu kommt es zu einer Stimulation der PKC-Aktivität und letztlich erhöhten CRP-Synthese, die sich in den verwendeten HepG2-ABEK14-Zellen in einem erhöhten RLU-Wert (relative light units) im Luziferase-Assay zeigt.

Reagenzien

-PDBu (Phorbol 12,13-dibutyrate)	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D)

2.3.2. Stimulation von HepG2-ABEK-14 Zellen mit Thrombin

Um den Effekt des Thrombins auf die CRP-Synthese zu untersuchen wurden HepG2-ABEK14-Zellen 24 h nach Ausplattieren in aufsteigender Konzentration mit Thrombin stimuliert. Nach weiteren 24 h erfolgte die Lyse der Zellen für weitere Untersuchungen. Die eingesetzten Konzentrationen von Thrombin betrugen 0,1/1/3 und 6 U/l.

Reagenzien

-Thrombin (human plasma)	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D)

2.4. Lyse

2.4.1. Lyse für den Luziferase-Assay

Für den Luziferase-Assay wurden die Zellen nach Absaugen des Kulturmediums zunächst 2x mit 1ml PBS gewaschen und anschließend mit GloLysis Buffer (1x) ca. 10 min bei 4 Grad auf einer Wippe lysiert (siehe 2.5. Luziferase Assay).

2.4.2. Lyse für den Western-Blot

Für den Western-Blot wurden die Zellen nach Absaugen des Kulturmediums zunächst 1x mit 5ml PBS gewaschen und anschließend mit 80 µl des folgenden Ansatzes 10 min bei 4 °C auf einer Wippe lysiert.

Tab. 2: Lyseansatz für Proteinvolllysat:

AEBSF = 4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid, CHAPS = [(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio] -l-Propansulfonsäure, EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure, H_2O = Wasser, HCL = Hydrogenchlorid, NET = **N**aCl+**E**DTA+**T**ris-HCL, PMSF = Phenylmethylsulfonylfluorid, Tris = Tris (hydroxymethyl)-aminomethan,

Reagenz	Für 1 ml Lysepuffer
Tris-HCL (NET)	ph 8,0
NaCl (NET)	100 µl
EDTA (NET)	
CHAPS 600 nM	10 µl
Iodoacetamide 10 mM	10 µl
10 % NP-40	100 µl
PMSF 0,1 M	0,5 µl
Protease-Inhibitor (AEBSF, EDTA, Bestatin, Leupeptin, Aprotinin)	20 µl
dd. H_2O	760 µl

Die lysierten Zellen wurden komplett in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt und 10 min bei 14000rpm und 4°C zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde bei -80 °C gelagert.

Alle verwendeten Reagenzien stammen von: (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D)

2.5. Luziferase-Assay

Das Chemolumineszenz-Verfahren ist eine validierte Methode um verschiedenste physiologische Vorgänge zu untersuchen. Es können Rezeptorfunktionen, Signalkaskaden, Transkriptionsfaktoren ebenso wie mRNA-Prozesse und Proteinfaltung analysiert werden. In diesem Fall wurde die Promotoraktivität für CRP im Zellkern dargestellt.

Mit Hilfe folgender chemischen Reaktion, in der Energie in Form von Licht freigesetzt wird, kann die transkriptionelle Aktivität im Zellkern durch das Luminometer bestimmt werden. Dabei gilt, dass je höher die Luciferase-Aktivität ist, desto höher ist auch die transkriptionelle Aktivität. Die Einheit beträgt relative light units (RLU).



Die Reaktion ist eine ATP-abhängige oxidative Decarboxylierung von Luciferin, katalysiert durch das Enzym Luciferase und Mg^{2+}.

Es wurde die CRP-Promoter-Aktivität in siRNA transfizierten und nicht transfizierten HepG2-ABEK14-Zellen untersucht. Die transfizierten Zellen wurden 72 h nach Transfektion für 24 h mit PDBu stimuliert und anschließend dem Versuch zugeführt. Die nicht transfizierten Zellen wurden ebenfalls nach 72 h für 24 h mit PDBu stimuliert.
Den in 24-Well Platten ausgesäten Zellen wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit jeweils 1 ml PBS gewaschen. Nach Zugabe von 100µl/Well

GloLysisBuffer und einer Inkubationszeit von 10 min wurden 100µl/Well Bright-Glo Luciferase Assay Buffer auf die HepG2-ABEK14-Zellen gegeben und sorgfältig suspendiert. Nach 1:1 Transferierung der Suspensionen in Luminometer-Tubes erfolgte die Messung im Luminometer bei 554 nm. Ein Leerröhrchen wurde zur Eichung mitgemessen.

Reagenzien

-GloLysis Buffer (1x)	(Promega, Mannheim, D)
-Bright-Glo™ Luciferase Assay Buffer	(Promega, Mannheim, D)
-Bright-Glo™ Luciferase Assay Substrate (lyophil.)	(Promega, Mannheim, D)

Geräte

-Luminometer: flash`n glow	(Berthold Tech., Bad Wildbad, D)

2.6. Proteinassay

Mit Hilfe des BCA-Tests (BCA = Bicichinonsäure) nach Pierce wurde die Proteinmessung durchgeführt. Der Test funktioniert nach folgendem Prinzip: Verbindungen mit mindestens zwei Peptidbindungen gehen in wässriger, alkalischer Lösung einen Komplex mit zweiwertigen Kupferionen ein (Biuret-Reaktion). Die Kupferionen werden reduziert und bilden mit Bicinchinon-Säure (BCA) einen violetten Farbkomplex. Je nach Proteingehalt der Lösung ergibt sich somit ein unterschiedliches Absorptionsmaximum. Zur Bestimmung des Proteingehalts wurde eine Standardkurve aus tiefgefrorenen Albumin-Proben mit definiertem Proteingehalt erstellt.

Die Proteinstandards mit den Konzentrationen 10, 20, 30, 40, 50 und 60 µg/ml und die zu untersuchenden Proteinlysate wurden langsam aufgetaut und nach folgendem Schema auf ein 96-Well pipettiert.

Standardreihe (µg/ml)			Pipettierschema der Proteinlysate (Konzentrationsverhältnisse Proteinlysate)			
			[1:50]	[1:50]	[1:100]	[1:100]
60						
50						
40						
30						
20						
10						
0						

Abb. 4: Pipettierschema 96-Well Platte für Proteinassays. Alle Proben wurden doppelt aufgetragen. Blau: Standards in steigender Konzentration. Grün: Proteinlysate in unterschiedlicher Konzentration. ml = Milliliter, µg = Mikrogramm

Im grün hinterlegten Teil des Pipettierschemas wurden die zu bestimmenden Proteinvolllysate aufgetragen. Der blau hinterlegte Teil diente zur Ermittlung der Standardkurve mit Hilfe der Albumin-Standards (10-60µg/ml). Die unterste Standardreihe (0 µg/ml) blieb proteinfrei.

Zunächst wurde in den grünen Teil und in die unterste Standardreihe 100 µl dd H_2O vorgelegt. Anschließend wurden 100 µl der Albuminstandards und 1-2 µl der Proben in die dafür vorhergesehenen Wells pipettiert. Jede Probe wurde jeweils doppelt aufgetragen. Mit einer Multipette wurden danach 100 µl des Detektionsreagenz auf alle Wells gegeben und es erfolgte eine Inkubation bei 60°C im Wärmeofen. Nach 1 h erfolgte die photometrische Messung bei 562 nm und die Auswertung mit der KC-4 Software am Computer.

Tab. 3:Ansatz Detektionsreagenz für den Proteinassay. Mischungsverhältnisse und -volumina für 1 ml Gesamtreagenz.
BCA = Bicinchinon-Säure, µl = Mikroliter, ml = Milliliter

Micro BCA™ Reagenz	Verhältnis	Für 1ml Reagenz
A	50%	500 µl
B	48%	480 µl
C	2%	20 µl

Material

-96 Well (Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, D)

Reagenzien

-Albumin Standard (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA)
-Micro BCA™ Reagent A (MA) (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA)
Reagent B (MB)
Reagent C (MC)

Geräte

-Multipette plus (Eppendorf, Hamburg, D)
-Photometer: Lambda K ELX808 (MWG-Biotech, Ebersberg, D)
-KC-4 Software (BioTek, Bad Friedrichshall, D)

2.7. Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Die hier verwendeten Polyacrylamidgele bilden (je nach Polyacrylamid-Gehalt) ein mehr oder weniger dichtes Netz. Die Proteine bleiben je nach Größe und Form an diesem Netz hängen. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird durch die angelegte Spannung reguliert. Es wurde eine SDS-PAGE (**S**odium **D**odecyl

Sulfate – **P**oly**A**crylamid **G**el **E**lectrophoresis) verwendet. Bei diesem Verfahren erfolgt die Auftrennung nur nach dem Gewicht und nicht nach der Ladung, da unterschiedliche Ionenladungen durch das SDS ausgeglichen werden. SDS (Natriumdodecylsulfat) ist ein anionisches Tensid und bindet stark an hydrophobe Regionen der Proteine und überdeckt die Eigenladung der Proteine so dass eine konstante negative Ladungsverteilung vorliegt. Durch Erhitzen der Proteine kommt es weiterhin zur Linearisierung der Proteine und entsprechenden Auftrennung im SDS-Page die ihrer Molekülmasse entspricht.

Die mit 2 Tris-Glycin-Gelen bestückte Western-Blot Kammer wurde zunächst mit 420ml Laufpuffer aufgefüllt. Der Laufpuffer wird bei Raumtemperatur in zehnfacher Konzentration gelagert und muss daher 1:10 verdünnt werden. Der Probenlaufpuffer wird bei -20°C gelagert und wird nachdem er Raumtemperatur erreicht hat mit einer äquivalenten Menge an Mercaptoethanol angesetzt. Aufgrund der Toxizität von Mercaptoethanol, dass stark atemwegs- und hautreizend ist, wurde der Versuch unter dem Digestorium durchgeführt. Dieser Probenlaufpuffer wurde anschließend 1:5 mit den Proteinproben (5-35µl) versetzt, das Gemisch 10min bei 95°C denaturiert und auf Eis gelagert. Mit der Microliter-Spritze wurden die Proben vollständig und ohne Blasenbildung in die Geltaschen gefüllt. Die erste Tasche wurde zusätzlich mit einem käuflichen Markerproteingemisch als Größenstandard, sog. „Leiter“, befüllt. Für den zweistündigen Trennvorgang wurde eine Spannung von 120 Volt gewählt. Sobald die vordere Laufwand das Gelende erreicht hatte wurde die Elektrophorese beendet.

Geräte

Western-Blot Kammer Minigel Twin G42	(Biometra, Göttingen, D)
Power Pack P25T	(Biometra, Göttingen, D)
pH-Meter pH538	(WTW Multical, Weilheim, D)

Reagenzien

Laufpuffer	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D)
Probenlaufpuffer	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D)
ProGel-Tris-Glycin-Gel 4-12%	(anamed, Groß-Bieberau/Rodau, D)
Precision Plus Protein Standards Kaleidoskope™	(Bio-Rad, Hercules, California, USA)
BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder	(Invitrogen/GIBCO, Groningen, NL)

Materialien

Microliter Syringes	(Hamilton, Reno, Nevada, USA)

2.8. Western-Blot

Das Übertragen der Proteine auf das Nitrozellulosepapier (Blotten) erfolgte mittels des „semi-dry“ Verfahrens. Hierbei wird zwischen zwei Kohleplatten ein senkrecht zum Elektrophoresegel gerichtetes elektrisches Feld erzeugt. Dadurch wandern die Proteine Richtung Anode zur Nitrozellulosemembran, wo sie dann aufgrund hydrophober Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken hängen bleiben.

Die blasenfreie Schichtung des Blots erfolgte wie in der Abbildung dargestellt:

Anode(+)
Filterpapier
Papier
Gel
Filterpapier
Kathode(-)

Abb. 5: Anordnung der Schichten beim Western-Blot

Die Filterpapiere und das Nitrozellulosepapier wurden vor dem Blotaufbau in Transferpuffer gelegt. Für die Übertragung der Proteine auf das Papier wurde eine konstante Stromstärke von 150-160 mA über eine Stunde appliziert.

Material

Hybond™-C Extra Nitrozellulose Membran	(Amersham-Pharmacia, Freiburg, D)
Blot Filter Paper	(Bio-Rad, Hercules, California, USA)
Falcon Röhrchen	(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)

Reagenzien

Transferpuffer pH 8,3	50ml Methanol	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D)

	1,514g TRIS-Base	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D)
	5,313g Glycin	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D)
	Ad 500ml dd A. bidest	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D)

Geräte

Blotgerät: Fastblot B43 (Biometra, Göttingen, D)

2.9. Detektion der Proteine mit Antikörpern

Zur Absättigung freier Bindungsstellen wurde das Nitrozellulosepapier nach dem Western Blot für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockpuffer auf dem Schwenktisch inkubiert. In einem zweiten Schritt erfolgte die Inkubation über Nacht mit einem der PKC-Isoform spezifischem Primärantikörper (siehe Tab. 4), der zuvor in 10 ml Blockpuffer verdünnt wurde. Nach fünfmaligem vorsichtigem Spülen für jeweils 5 min mit Waschpuffer wurden nicht gebundene Primärantikörper entfernt. Der ebenfalls in 10 ml Blockpuffer gelöste Sekundärantikörper, der an den Primärantikörper bindet und an das Enzym HRP (Horse Radish Peroxidase) gekoppelt ist, wurde für 1 Stunde dazugegeben.

Reagenzien

Blockpuffer	5g Magermilchpulver	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D)
	1ml 10% Tween 20	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D)
	ad 100ml 1xPBS	(Universität Ulm, Ulm, D)
Waschpuffer	100ml 10x PBS	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D)
	10ml 10% Tween 20	(Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D)
	890 ml A.bidest	(Universität Ulm, Ulm, D)

Tab. 4: Übersicht der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper PKC δ/ε

h = Stunde, HRP = Horse radish peroxide, Ig = Immunglobulin, PKC = Proteinkinase C.

Primär-Antikörper				
Bezeichnung	***Art***	***Inkubationszeit/ Temperatur***	***Verdünnung***	***Hersteller***
PKCδ (c-17) sc-213	*Rabbit polyclonal IgG*	*über Nacht; 4°C*	*1:1000*	*Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA*
Anti PKCε #p8458	*Rabbit, polyclonal IgG*	*über Nacht; 4°C*	*1:2000*	*Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D*
Sekundär-Antikörper				
Bezeichnung	***Art***	***Inkubationszeit/ Temperatur***	***Verdünnung***	***Hersteller***
Anti-rabbit-Ig/HRP	*Swine, polyclonal*	*1 h; Raumtemperatur*	*1:3000*	*Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark*

2.10. Filmentwicklung

Nach Zugabe des Sekundärantikörpers wurde die Nitrozellulosemembran erneut fünfmal 5 min in Waschpuffer inkubiert und anschließend 1 min in ECL Western Blotting Substrate getaucht. Das Luminol im ECL Substrate wird durch die Meerrettichoxidase (HRP) oxidiert, woraufhin es zu einer Chemolumineszenzreaktion und zur Belichtung des Films kommt. Dazu wurde die Membran luftblasenfrei in eine Frischhaltefolie verpackt und der Röntgenfilm für 1-5 Stunden (je nach Intensität des Signals) in einer Film-Kassette belichtet. Abschließend erfolgte die Entwicklung des Röntgenfilms in einer Filmentwicklungsmaschine.

Material

Amersham Hyperfilm™ ECL (General Electrics Healthcare, Chalfont St Giles, UK)

Reagenzien

ECL Western Blotting Substrate	(Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois, USA)

Geräte

Filmentwicklungsmaschine XOMAT M35	(Kodak, New York, USA)
Film-Kassette	(General Electrics Healthcare, Chalfont St Giles, UK)

2.11. Stripping zur α-Tubulin Ladungskontrolle

Die α-Tubulin Ladungskontrolle wurde durchgeführt um zu bestimmen, ob in den jeweiligen Versuchen die gleiche Menge Protein im Western Blot aufgetragen wurde. Alpha-Tubulin eignet sich hervorragend dafür, da es ubiquitär in eukaryoten Zellen als Bestandteil der Mikrotubuli auftaucht. Durch das Strippen können Primär- und Sekundärantikörper von Western Blot Membranen wieder entfernt werden, um eine Detektion weiterer Proteine mit Hilfe anderer Antikörper auf demselben Blot durchzuführen. Hierzu wurde die Membran für 15 min auf einem Schwenktisch in Restore™ Western Blot Stripping Buffer inkubiert. Danach wurde die Membran 20 min in Waschpuffer gewaschen und erneut für 1 Stunde mit Blockpuffer geblockt.
Anschließend konnte der Primärantikörper gegen alpha-Tubulin zugegeben werden. Der Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:3000 gelöst in Blockpuffer für 45 min zugegeben. Als Sekundärantikörper wurde ein Anti-mouse IgG-1 HRP Antikörper in der Konzentration von 1:2000 für 45 min verwendet. Nach einem erneuten Waschvorgang mit Waschpuffer und Zugabe von ECL Substrat wurde wie oben beschrieben der Röntgenfilm belichtet.

Reagenzien

Restore™ Western Blot Stripping Buffer	(Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)
Blockpuffer	5g Magermilchpulver
	1ml 10% Tween 20
	ad 100ml 1xPBS (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D)
Waschpuffer	100ml 10x PBS
	10ml 10% Tween 20
	890 ml A.bidest (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D)

Tab. 5: Übersicht der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper zur α-Tubulin-Ladungskontrolle
HRP = Horse radish peroxid, Ig = Immunglobulin, min = Minuten.

Primär-Antikörper				
Bezeichnung	***Art***	***Inkubationszeit/ Temperatur***	***Verdünnung***	***Hersteller***
Anti-α Tubulin Clone B-5-1-2	*Mouse, monoclonal*	*45 min; Raumtemperatur*	*1:3000*	*Sigma, Saint Louis, Missouri,USA*
Sekundär-Antikörper				
Bezeichnung	***Art***	***Inkubationszeit/ Temperatur***	***Verdünnung***	***Hersteller***
Anti-Mouse IgG-HRP	*Rabbit, polyclonal*	*45 min; Raumtemperatur*	*1:2000*	*Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA*

2.12. Statistik

Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit Hilfe der Statistiksoftware SigmaStat Version 2.0 von Jandel Corporation. Für die Berechnung der Signifikanzen wurde der student´s t-test für verbundene Stichproben angewendet. Als statistisch signifikant wurden p-Werte <0,05 und als hochsignifikant p-Werte <0,001 angesehen.

Software

SigmaStat Version 2.0 (Jandel Corporation, San Rafael, California, USA)

3 Ergebnisse

3.1. Capsel-reaktives Protein-Promoteraktivität in siRNA transfizierten HepG2-ABEK-14 Zellen

Es wurde die CRP-Promotoraktivität in HepG2-ABEK14-Zellen nach Transfektion mittels 100nM siRNA, die spezifisch die codierenden Genabschnitte für die Enzyme PKC δ und PKC ε inaktiviert, gemessen und analysiert.

Nach Ausplattieren der Zellen mit einer Dichte von 60000/Well auf einer 24 Well-Platte erfolgte 24 h später die Transfektion mit der entsprechenden siRNA. 72 h nach Transfektion wurden die Zellen mit 100nm PDBu für 24 h inkubiert, um die Proteinkinase C Synthese zu stimulieren. Weitere 24 h danach wurden Proteinvollysate der Zellen angefertigt, die später der Analyse durch Western Blot und Luziferase Assay zugeführt wurden. Der Luziferase Assay diente der quantitativen Aktivitätsbestimmung der CRP-Promoter in den Zellen. Die qualitative Analyse des PKC-Knockdowns erfolgte durch das Western Blot Verfahren für die zwischen 5 und 35 µl Proteinvolllysate der transfizierten und nicht-transfizierten Proben verwendet wurden. Der immunologische Nachweis der PKC-Isoformen wurde durch Erstantikörper in den Konzentrationen 1:1000 für δ und 1:2000 für ε und anschließend Inkubierung mit dem Zweitantikörper in einer Konzentration von 1:3000 erreicht. Durch die gleichzeitig durchgeführte Neg siRNA Kontrollprobe konnte eine Abschwächung, d.h. Knockdown der PKC-Isoformen, bewiesen werden.
Zur Ladekontrolle in den Versuchen diente die Immundetektion von α-Tubulin, ein konstitutiv exprimiertes Strukturprotein. Um Meßfehlern durch unterschiedliche Zell- bzw. Proteinkonzentrationen auszuschließen erfolgte eine Bestimmung der Gesamtproteinmenge pro Well und eine rechnerische Korrektur der Luziferase Assay Ergebnisse auf einen einheitlichen Protein-Bezugswert. Es wurden zu jeder Isoform jeweils 3 unabhängige Versuche durchgeführt, die wiederum 3-mal wiederholt wurden. Die Ergebnisse wurden anschließend statistisch mit SigmaStat 2.0 auf Signifikanz hin untersucht und werden im folgenden Teil dargestellt.

3.1.1. Knockdown der Proteinkinase C δ durch siRNA Transfektion – Bestimmung der Capsel-reaktives Protein-Promoteraktivität

Für die Proteinkinase C δ wurden für die Immundetektion, der Primärantikörper in einer Konzentration von 1:1000 angesetzt. Der Zweitantikörper in einer Konzentration von 1:3000 . Nach einer Belichtungszeit von 60 min wurden die Bilder entwickelt.

Es konnte eine Aktivitätsminderung des CRP-Promoters nach PKCδ –Knockdown in den HepG2-ABEK14-Zellen festgestellt werden. Die relative Änderung der Promoteraktivität in Neg siRNA transfizierten Zellen gegenüber mit komplementärer PKCδ transfizierten Zellen erwies sich als hochsignifikant ($p<0,001$).

In der unteren Abbildung erkennt man deutlich die Abschwächung der Banden für transfizierte Zellen, was einem erfolgreichen PKCδ- Knockdown entspricht.

Ergebnis:

1. Eine Beteiligung der PKCδ an der CRP-Synthese ist wahrscheinlich.
2. Eine Hemmung der PKC durch die Methode der RNA-Interferenz ist möglich.

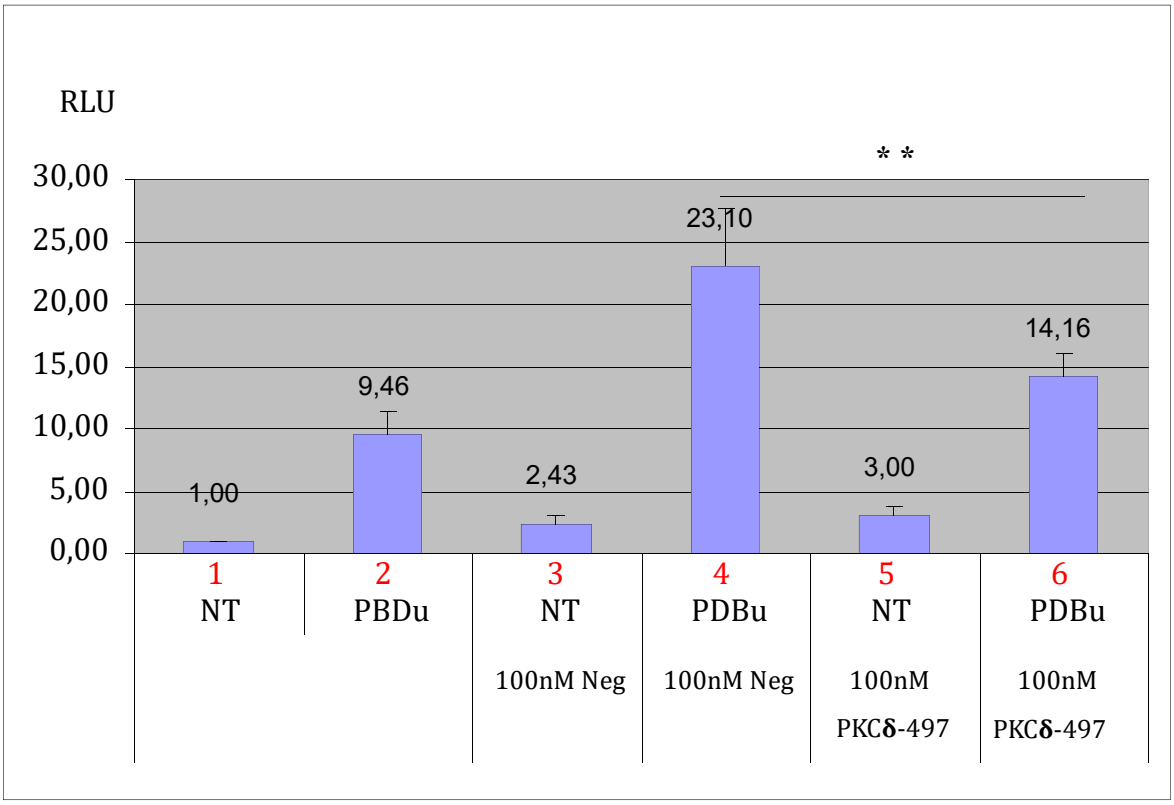


Abb. 6: Relative Aktivitätsänderung des CRP-Promoters in PKCδ-Knockdown-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen und der siRNA-Negativkontrolle.

Gezeigt ist die CRP-Promoteraktivitätsänderung in stabil mit siRNA transfizierten PCKδ-Knockdownzellen (PKCδ, Balken 5 und 6) im Vergleich zu untransfizierten Zellen (Balken 1 und 2) sowie mit negativer siRNA transfizierten Zellen (Negativkontrolle mit inaktiver siRNA, Balken 3 und 4) vor und nach Stimulation mit PDBu. Es zeigt sich eine signifikant erniedrige CRP-Promoteraktivität in PKCδ-Knockdownzellen im Vergleich zu der Negativkontrolle. Es zeigte sich weiterhin eine gesteigerte CRP-Promoteraktivität in den sowohl mit Negativ-siRNA als auch mit PKCδ-siRNA transifizierten Zellen.

CRP = Capsel-reaktives protein, nM = Nanomol, Neg = nichtbindende siRNA, NT = non treated, PDBu = 4α-Phorbol 12,13-Dibutyrate, PKCδ = Proteinkinase C -Isoform δ, RLU=relative light units, siRNA = small interfering Ribonukleinsäure. n=9 **=p<0.001

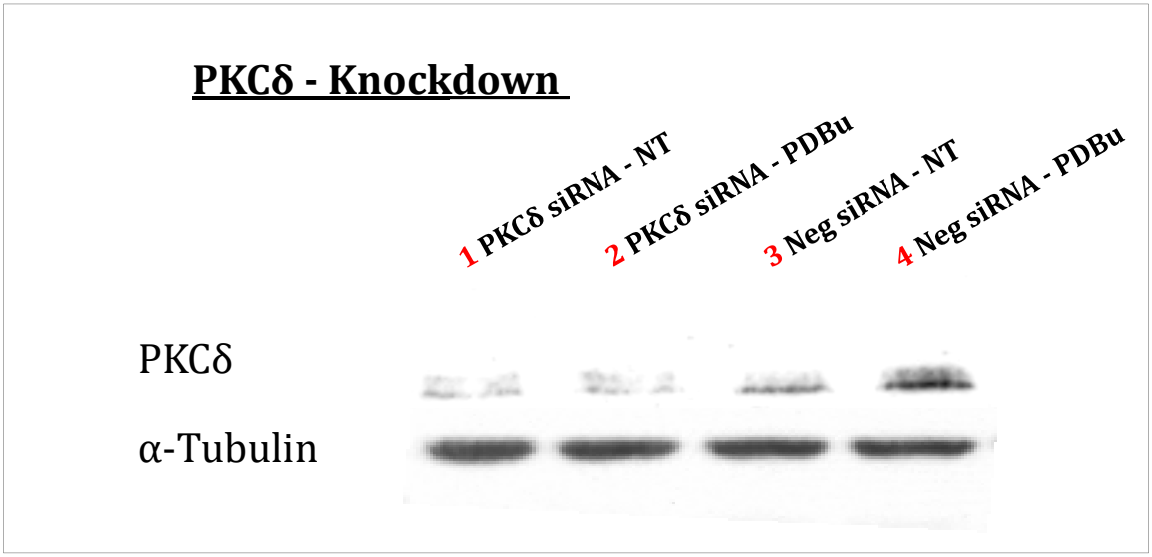


Abb. 7: PKCδ-Knockdown in stabil transfizierten HepG2-ABEK14-Zellen, Darstellung im Western-Blot.

Es zeigt sich eine deutliche Abschwächung der Banden für die mit komplementärer PKCδ-siRNA transfizierten Zellen (Spalte 1 und 2) gegenüber zur Negativkontrolle (Spalte 3 und 4) als Zeichen für einen erfolgreichen Knockdown der Proteinkinase C δ. Aufgeführt sind Zellproben vor und nach Stimulation mit 100 nM PDBu. Die Konzentrationen der jeweilig eingesetzten siRNA betrug 100nM.
Neg = nichtbindende siRNA, nM = Nanomol, NT = non treated, PDBu = 4α-Phorbol 12,13-Dibutyrate, PKCδ = Proteinkinase C -Isoform δ, siRNA = small interfering Ribonukleinsäure. n=9

3.1.2. Knockdown der Proteinkinase C ε durch siRNA Transfektion – Bestimmung der Capsel-reaktives Protein-Promoteraktivität

Für die Proteinkinase C ε wurden für die Immundetektion, der Primärantikörper in einer Konzentration von 1:2000 angesetzt. Der Zweitantikörper in einer Konzentration von 1:3000 . Nach einer Belichtungszeit von 45 min wurden die Bilder entwickelt.Es konnte eine Aktivitätsminderung des CRP-Promoters nach PKCε – Knockdown in den HepG2-ABEK-14-Zellen festgestellt werden. Die relative Änderung der Promoteraktivität in Neg siRNA transfizierten Zellen gegenüber mit komplementärer PKCε transfizierten Zellen erwies sich als hochsignifikant ($p<0,001$). In der unteren Abbildung erkennt man deutlich die Abschwächung der Banden für transfizierte Zellen, was einem erfolgreichen PKCε- Knockdown entspricht.

Ergebnis:

1. Eine Beteiligung der PKCε an der CRP-Synthese ist wahrscheinlich.
2. Eine Hemmung der PKCε durch die Methode der RNA-Interferenz ist möglich.

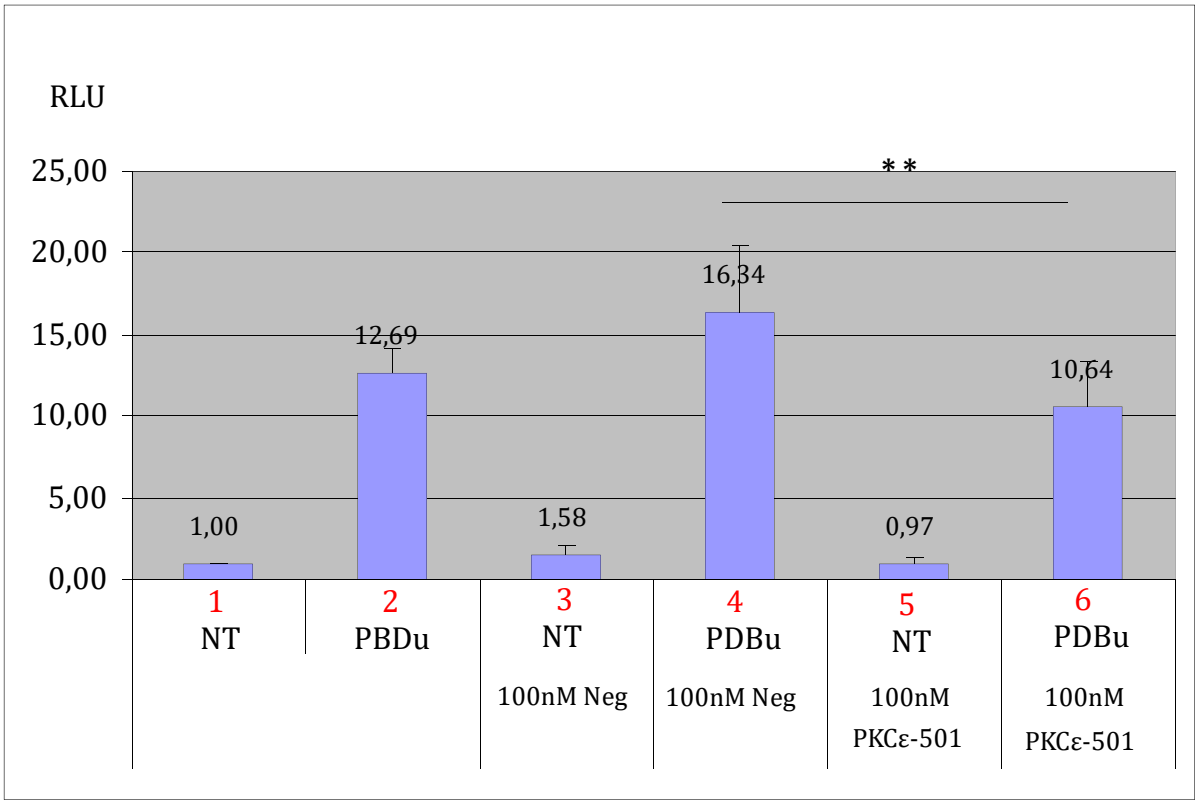


Abb. 8: Relative Aktivitätsänderung des CRP-Promoters in PKCε-Knockdown-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen und der siRNA-Negativkontrolle..

Gezeigt ist die CRP-Promoteraktivitätsänderung in stabil mit siRNA transfizierten PCKε-Knockdownzellen (PKCε, Balken 5 und 6) im Vergleich zu untransfizierten Zellen (Balken 1 und 2) sowie mit negativer siRNA transfizierten Zellen (Negativkontrolle mit inaktiver siRNA, Balken 3 und 4) vor und nach Stimulation mit PDBu. Es zeigt sich eine signifikant erniedrige CRP-Promoteraktivität in PKCε-Knockdownzellen im Vergleich zu der Negativkontrolle. Es zeigte sich weiterhin eine gesteigerte CRP-Promoteraktivität in den sowohl mit Negativ-siRNA als auch mit PKCε-siRNA transifizierten Zellen.

CRP = Capsel-reaktives protein, Neg = nichtbindende siRNA, nM = Nanomol, NT = non treated, PDBu = 4α-Phorbol 12,13-Dibutyrate, PKCε = Proteinkinase C -Isoform ε, RLU=relative light units, siRNA = small interfering Ribonukleinsäure. n=9 **=$p<0.001$

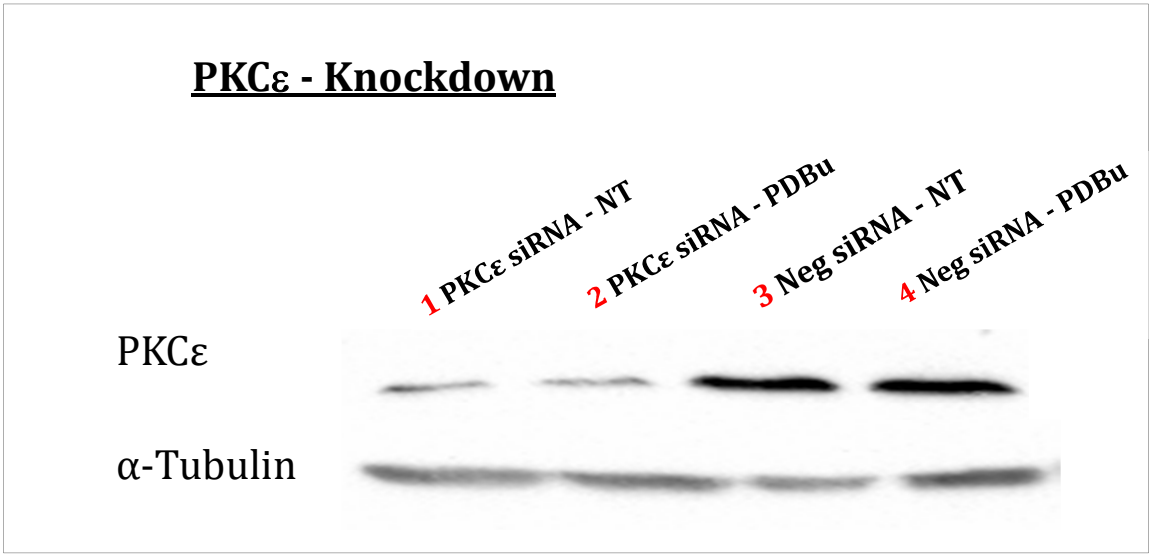


Abb. 9: PKCε-Knockdown in stabil transfizierten HepG2-ABEK14-Zellen, Darstellung im Western-Blot.

Es zeigt sich eine deutliche Abschwächung der Banden für die mit komplementärer PKCε-siRNA transfizierten Zellen (Spalte 1 und 2) gegenüber zur Negativkontrolle (Spalte 3 und 4) als Zeichen für ein erfolgreiches Knockdown der Proteinkinase C ε. Aufgeführt sind Zellproben vor und nach Stimulation mit 100nM PDBu. Die Konzentrationen der jeweilig eingesetzten siRNA betrug 100nM.
Neg = nichtbindende siRNA, nM = Nanomol, NT = non treated, PDBu = 4α-Phorbol 12,13-Dibutyrate, PKCε = Proteinkinase C -Isoform ε, siRNA = small interfering Ribonukleinsäure. n=9

3.2. Capsel-reaktives Protein-Synthese in HepG2-ABEK14-Zellen nach Stimulation mit Thrombin

Ziel dieses Versuches war es, einen möglichen Angriffspunkt der CRP-Synthese durch die verfügbaren Thrombininhibitoren zu eruieren. Eine Beteiligung des Thrombins an der CRP-Synthese in Leberzellen wird vermutet, eine Hemmung derselben wäre einfach und kostengünstig durchführbar.
Gemessen wurde die relative Aktivitätsänderung des CRP-Promoters in HepG2-ABEK14-Zellen nach Stimulation mit Thrombin. Nach dem Ausplattieren der Zellen erfolgte nach 24 Stunden eine Stimulation in aufsteigender Konzentration von 0,1/1,0/3,0/6,0 U/ml. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt. Die Erfassung der CRP-Promoteraktivität erfolgte mit Hilfe von Luziferase-Assays 48 Stunden nach Stimulation mit Thrombin.

Thrombin aus humanem Plasma wurde von der Firma Sigma-Aldrich bezogen. Nach Inkubation von 48 Stunden Dauer wurde die Aktivität des CRP-Promoters mit Hilfe des Luziferase-Assays ausgewertet. Hierfür erfolgte eine Mitbestimmung des Gesamtproteins um Schwankungen in den Gesamtproteinkonzentrationen des jeweiligen Ansatzes auszugleichen. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Effekt der mit Thrombin stimulierten Zellen auf die CRP-Synthese im Vergleich zu den unbehandelten Zellen.

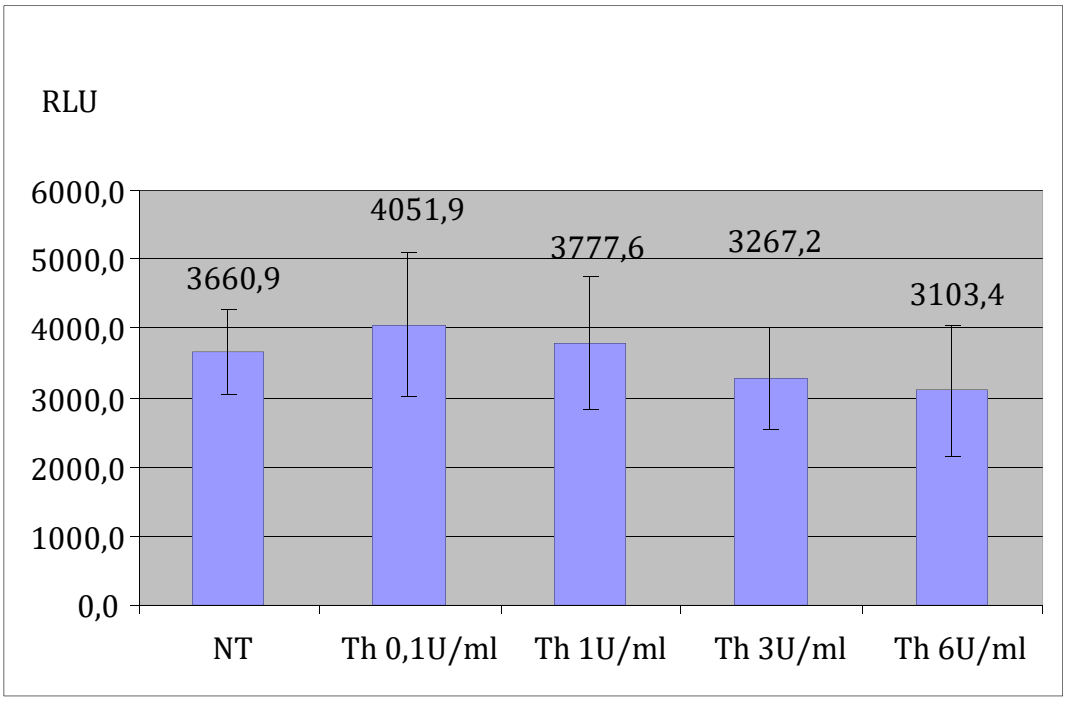


Abb. 10: Relative Änderung der CRP-Promoteraktivität in HepG2-ABEK14-Zellen nach Stimulation mit humanem Thrombin in ansteigender Konzentration. Die Messung der Luziferase-Aktivität erfolgte nach 48 Stunden. Es zeigte sich kein signifikanter Anstieg der Promoteraktivität. Somit ergibt sich kein Hinweis, dass Thrombin ein Aktivator des CRP-Promoters in dieser Zellreihe ist. CRP = Capsel-reaktives Protein, ml = Milliliter, NT = non treated, RLU = relative light units, Th = Thrombin, U = Unit. n=3.

4 Diskussion

4.1. Capsel-reaktives Protein und Arteriosklerose

In den vergangenen Jahrzehnten wurden große Fortschritte im Verständnis der Pathogenese der Arteriosklerose gemacht. Eine ganze Reihe klassischer Risikofaktoren konnte inzwischen nachgewiesen und bestätigt werden. In den letzten Jahren kommt der Diskussion um CRP als eigenständiger Risikofaktor immer mehr Bedeutung zuteil. In vielen Studien konnte eine Korrelation zwischen erhöhten hsCRP-Blutspiegeln als Marker und dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse nachgewiesen werden [56, 75]. Die hier erwähnten erhöhten hsCRP-Spiegel befinden sich im oberen Normbereich und müssen von den deutlich erhöhten CRP-Spiegeln bei akuten Infektionen unterschieden werden. Es konnte gezeigt werden, dass CRP bereits sehr früh in arteriosklerotischen Läsionen zu finden ist [150], mit Komplement in der Wand assoziiert vorliegt [152] und Komplement aktivieren kann [164, 171], welches wiederum Chemokine freisetzt und die SMC proliferieren lässt [101]. Weiterhin reguliert CRP die eNOS herunter und hemmt so die vasoprotektiven Eigenschaften des Stickstoffmonooxids. Entscheidend jedoch scheint die Eigenschaft zu sein, die Schaumzellbildung z.B. durch Opsonierung des LDLs zur besseren Aufnahme in die Monozyten zu fördern [181]. Jedoch sprechen genetische Studien gegen eine kausale Involvierung des CRPs in die Arteriogenese [18, 37].

Aufgrund der oben genannten Involvierung und einer möglicherweise kausalen Bedeutung des CRP im Mechanismus der Arteriosklerose erscheint ein Eingriff in dieses System zur Prophylaxe bzw. Therapie sinnvoll. Dies könnte gleichzeitig einen Hinweis auf die kausale Beteiligung des CRP liefern. Denkbare Mechanismen zur Inhibierung der Effekte des CRPs am Wirkort wären:

(1) Rezeptorhemmung: CRP wirkt unter anderem über Fcγ-Rezeptoren [9, 136]. Die Fcγ-Rezeptoren erfüllen eine Vielzahl grundlegender Funktionen im humoralen und zellulären Immunsystem. Sie finden sich im gesamten hämatopoetischen System, u.a. auf Monozyten, Mastzellen, B-Lymphozyten und Granulozyten. Die Bindung von Immunkomplexen an diesen Rezeptoren steuert die Phagozytoseaktivität, die

Endozytose von IgG-gebundenen Partikeln, die Freisetzung von Entzündungsmediatoren und vielem mehr [84]. Die Hemmung dieser Rezeptoren erscheint jedoch nicht vielversprechend da sie unterschiedliche Aufgaben erfüllen und somit Nebenwirkungen, v.a. durch die Hemmung des Immunsystems, sehr wahrscheinlich auftreten würden. Auch ist durch die Hemmung der Fcγ-Rezeptoren vermutlich kein Effekt auf das Komplementsystem zu erwarten.

(2) Hemmung der CRP-vermittelten Komplementaktivierung: Das Komplementsystem könnte an der Entstehung der Arteriosklerose beteiligt sein und kann durch CRP aktiviert werden. Eine Hemmung des Komplementsystems könnte somit eine wirksame Prophylaxe bzw. Therapie der Arteriosklerose darstellen. Am vielversprechendsten erscheint die Hemmung der bindenden C1q-Untereinheit in der Komplementkaskade zu sein. Aus sterischen Gründen konnte dies aber bisher noch nicht realisiert werden.

(3) Crosslinking: Pepys et al. stellten 2006 eine Methode vor in der durch Vernetzung der Untereinheiten des CRPs, wobei 5 Moleküle des Wirkstoffes 1,6-bis(phosphocholine)-hexane von 2 CRP-Pentameren gebunden werden, die Ligandenbindung des CRP verhindert wird. Das synthetisierte 1,6-bis(phosphocholine)-hexane wurde, unter Gabe von humanem CRP, an Ratten mit provoziertem Myokardinfarkt erprobt. Es zeigte sich ein signifikant gebessertes outcome bezüglich Infarktgröße und kardialer Dysfunktion [107]. Aufgrund der fehlenden Spezifität dieses Moleküls kam es nicht zur Erprobung am Menschen. Die Fcγ-Rezeptoren werden ebenfalls bei dieser Methode nicht berücksichtigt.

(4) Antisense-Technik: Durch einzelsträngige komplementär zur Ziel-mRNA gerichtete RNA kann die Translation des CRPs vermindert werden. Hierzu gibt es aber bisher nur wenige Studien, die Wirkung konnte jedoch bisher an Mäusen, Ratten, Hasen und an gesunden Menschen belegt werden [51, 66, 139, 177].

(5) In dieser Arbeit soll auf die fünfte Möglichkeit eingegangen werden: Die Hemmung der CRP-Synthese. Wie unter Punkt 4 bereits erwähnt wurde 2012 die Hemmung der Translation des CRP-Moleküls durch die RNA-Interferenz erfolgreich in vitro und in vivo von Szalai et al. durchgeführt und veröffentlicht. Die Arbeitsgruppe erreichte ein Absinken des CRP-Levels in CRP-transgenen Mäusen die an kollagen-induzierter Arthritis litten und eine Besserung ihrer Symptome. Es ist bekannt, dass die Symptome bzw. Ausprägung vieler Erkrankungen des rheumatischen

Formenkreises mit der Höhe des CRPs korrelieren. In einem zweiten Schritt wurde das Medikament gesunden Menschen verabreicht. Es wurde gut vertragen und es kam wie erwartet zum Absinken des CRP-Wertes [66]. Insgesamt stellt dieses Prinzip einen sehr vielversprechenden Ansatz dar, der aktuell Gegenstand weiterer Studien ist. In unserer Arbeit wurde, analog zu den Arbeiten zu Szalai, ebenfalls die Methode der RNA-Interferenz gewählt. Als Ansatz erfolgte jedoch die Hemmung der Synthese der vermutlich an der CRP-Bildung beteiligten Proteinkinase C. Das Ziel war es nicht die Translation des CRPs zu verhindern, sondern die Induktion der Produktion des CRPs an sich zu hemmen. Somit könnte man Kollateralschäden, die z.B. durch relativ unspezifische Hemmung der Fcγ-Rezeptoren oder Eingriff in das Komplementsystem entstehen würden, vermeiden bzw. verringern. Ein weiterer Vorteil wäre, dass alle Teilaspekte der CRP-Effekte berücksichtigt und geschwächt werden würden. So würden letzlich nicht nur einzelne der vermutlich vielfältigen proatherogenen Auswirkungen des CRPs durch z.B. Aktivierung des Komplementsystem oder CRP-Rezeptoren gehemmt, sondern durch Inhibition der Synthese des CRPs natürlich auch alle weiteren evtl. bisher unbekannten zur Arteriosklerose führenden Effekte.

Drei aktuell klinisch bereits verfügbare Medikamentengruppen, die aktuell im Fokus stehen, sollen hier noch erwähnt werden. Zum einen sind dies die beta-HMG-Reduktase-Hemmer (Statine). In der JUPITER-Studie konnte gezeigt werden, dass Patienten ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren und normalen LDL-Werten aber erhöhten CRP-Werten hinsichtlich dem Auftreten zukünftiger kardiovaskulärer Ereignisse von einer Behandlung mit einem HMG-CoA-Reduktase-Hemmer profitierten [149]. In dieser Studie wurde der Frage nachgegangen, ob gesunde Probanden mit normalem LDL-Cholesterin kleiner 3,4mmol/l aber erhöhten hsCRP-Werten über 2mg/l von einer Therapie mit 20mg Rosuvastatin im Vergleich zu Placebo hinsichtlich einer Primärprävention gegenüber kardiovaskulären Erkrankungen profitieren würden. Primärer Endpunkt war das Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen wie z.B. Myokardinfarkt, instabile Angina pectoris oder ischämischer Schlaganfall. Nach ca. 2 Jahren wurde die Studie gestoppt. In der Behandlungsgruppe zeigte sich eine Senkung des LDL-Wertes um ca. 50% und des hsCRP-Spiegels um ca. 37%. Das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse war in der Verum-Gruppe um hochsignifikante 44% reduziert [112]. Es bleibt aber unklar, ob die

Senkung der CRP-Spiegel unter Statintherapie tatsächlich den Statinen zugeschrieben werden kann oder ob es sich nicht um einen Marker handelt, der das jetzt geringere kardiovaskuläre Risiko unter einer Statintherapie anzeigt. Eine gezielte Senkung der CRP-Spiegel durch Statine konnte bisher noch nicht bewiesen werden und ist Gegenstand weiterer Studien. Die Therapie mit Statinen war in der JUPITER-Studie so effizient, dass sie sogar einer Kombinationstherapie mit ASS und Antihypertensiva hinsichtlich der number needed to treat (NNT) überlegen war [114]. Es gab aber auch Kritik an der JUPITER-Studie. So kritisierten de Lorgeril et al. die nur sehr kurze follow-up Zeit von knapp 2 Jahren. Weiterhin seien die Diskrepanzen zwischen der Reduktion nicht-fataler ischämischer Ereignisse und der fehlenden Auswirkungen auf die Mortalität durch Schlaganfall oder Myokardinfarkt ungewöhnlich [30]. Dennoch wird seit 2009 diese Therapie von der Canadian Cardiovascular Society bei Patienten mit intermediärem Risiko (Framingham risk score oder Reynolds risk score 5-10% u. 10-20%) und erhöhtem hsCRP-Wert, auch bei niedrig-normalen LDL-Werten zur Primärprävention empfohlen [46, 115]. Ob jedoch die Patienten von einer Senkung des moderat erhöhten CRPs oder einer weiteren Senkung des LDL-Cholesterins profitierten konnte in der JUPITER-Studie nicht endgültig geklärt werden. Die Senkung des CRPs könnte ein Epiphänomen sein und evtl. nur einen Marker für die positive Wirkung der Senkung des LDL-Wertes darstellen. Eine direkte Hemmung des CRPs könnte den Beweis einer Beteiligung an der Entstehung der Arteriosklerose erbringen.

Eine weitere Medikamentengruppe die im Fokus steht sind die kardialen Glykoside. Kolkhof et al. konnten in HepG2-ABEK14-Zellen, mit Hilfe eines high-throughout screenings (HTS), kardiale Glykoside als Hemmer der CRP-Synthese identifizieren. In weiteren Versuchen zeigten Kolkhof et al. eine signifikante Hemmung der IL-1β und IL-6 vermittelten Synthese von CRP in Hepatomzellen sowie primären humanen Leberzellen durch Ouabain und Digitoxin. Diese Wirkung trat nach Elimination der aktiven Gruppen der Moleküle nicht auf. So zeigten die Präparate Gitoxigenin und Digitonin weder einen Effekt auf die NA^+/K^+-ATPase noch auf die CRP-Synthese. Der Effekt der CRP-Synthese-Hemmung scheint hierbei durch die Steigerung der intrazellulären Calciumkonzentration bedingt zu sein. Das Präparat Calcimycin, ein aus Pilzkulturen isoliertes Ionophor, wird genutzt um die intrazelluläre Konzentration an Calcium zu erhöhen. Kolkhof et al. konnten zeigen, dass sich durch Calcimycin

ebenfalls die CRP-Synthese hemmen lässt. Bei den Glykosiden korrelierte die Hemmwirkung nahezu linear mit der eingesetzten Dosis und wäre in der klinischen Anwendung somit gut steuerbar [77]. Dies stellt insofern einen sehr interessanten Ansatz dar, da kardiale Glykoside in der täglichen klinischen Routine seit Jahrhunderten verfügbar sind, eine große Erfahrung im Umgang damit besteht und in weitem Ausmaß in der Therapie der Herzinsuffizienz und des tachykarden Vorhofflimmerns Anwendung finden [92]. Durch diese Methode kommt es erst gar nicht zur Entstehung des CRPs. Somit wären alle Effekte des CRPs auf das Komplementsystem, die Fcγ-Rezeptoren u.a. gehemmt. Eine klinische Anwendungsbeobachtung mit kardialen Glykosiden zur CRP-Senkung ist bereits gestartet und die Ergebnisse werden mit Spannung erwartet. Hier soll zunächst die Wirksamkeit beim Menschen gezeigt werden. In einem zweiten Schritt soll dann die Effizienz in der Prävention kardiovaskulärer Ereignisse untersucht werden.

In einer kürzlich erschienen Arbeit konnte Jialai et al. einen neuen vielversprechenden Ansatz vorstellen. Der Peptid-Inhibitor (CRP-i2) konnte in ersten Versuchen die pro-inflammatorischen Effekte des CRP wie z.B. Superoxid Anion Induktion, NFkb Aktivität und Entzündungsmediatoren-release durch Monozyten vermindern [65]. Es wird nicht die Synthese gehemmt, sondern Einfluss auf die durch CRP ausgelöste Kaskade genommen.

4.2. Diskussion des Versuchsmodells

2004 wurde eine mit einem Luziferasekonstrukt stabil transifizierte Hep-G2-Zellreihe, HepG2-ABEK14, von unserer Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit der Sanofi Aventis Group hergestellt. Vorteil dieser Zellen ist eine Stimulierbarkeit mit PDBu und die Möglichkeit der Durchführung eines high-throughout screenings zur Identifizierung möglicher Wirkstoffe mit hemmender Wirkung auf die CRP-Synthese (siehe oben kardiale Glykoside) [63]. Die Zellen sind, im Gegensatz zu primären Leberzellen, in ausreichendem Umfang vorhanden, gut zu kultivieren und zu expandieren.

HepG2-ABEK14 ist eine Zelllinie die aus einem hepatozellulären Karzinoms eines 11-jährigen argentinischen Jungen gewonnen wurde. Sie besitzen eine große Ähnlichkeit

zu humanen primären Leberzellen und behalten im Gegensatz zu primären Hepatozyten ihre Teilungsaktivität bei [48, 72, 73]. Von Voraussetzung für unsere Arbeit ist ihre Eigenschaft CRP zu produzieren [138]. Trotzdem unterscheiden sie sich hinsichtlich Struktur, Enzymvorkommen bzw. -verteilung, Rezeptoren intrazellulär, d.h. im Zytosol und Zellkern und membranären Rezeptoren. So konnte z.B. gezeigt werden, dass eine Superinduktion durch parallele Stimulation durch Interleukin 1, Interleukin 6 und PDBu in HepG2-ABEK14-Zellen erreicht werden konnte, in PHH trat dieser Effekt aber nicht auf [63].

Das Volumen des Nährmediums, welches in die Wells gegeben wurden, betrug bei jedem Versuch 10 ml. Auch alle weiteren Bedingungen der Versuche wurden standardisiert. So waren Luftfeuchtigkeit, Temperatur, Zelldichte und Luftzusammensetzung stets konstant. Es sind weitere Untersuchungen notwendig um zu prüfen, ob die Ergebnisse die hier mit HepG2-ABEK14-Zellen erlangt worden auf humane primäre Leberzellen übertragbar sind. In einem nächsten Schritt müssen Studien in vivo erfolgen. Die in Kultur mit PHH erzielten Ergebnisse könnten sich eventuell nicht uneingeschränkt reproduzieren und in ein humanes System übertragen lassen. Das liegt daran, dass sich PHH, obwohl sie als Goldstandard für in vitro-Versuche hepatischer Systeme gelten, hinsichtlich Morphologie, Gen- und Proteinexpression zum Teil beträchtlich von nativen Leberzellen in vivo unterscheiden [54, 156, 157].

4.3. Proteinkinase C δ/ε – Mögliche Angriffspunkte der Syntheseinhibierung

Dass die Proteinkinasen an der tanskriptionellen Regulation der CRP-Synthese in humanen Hepatozyten und HepG2-ABEK14-Zellen beteiligt sind wurde 2004 erstmals von Ivashchenko et al. nachgewiesen [63]. Diese Vermutung beruht darauf dass eine Aktivierung des NF-κB Transkriptionsfaktors durch Beteiligung der PKC stattfindet. Mehrere Studien belegen eine Verbindung zwischen PKC und NF-κB [47, 96, 137]. Weiterhin weiß man, dass NF-κB und C/EBP wichtige Transkriptionsfaktoren in der Synthese des CRP darstellen [63]. In den hier durchgeführten Versuchen sollte der Einfluss der Proteinkinasen C δ und ε auf die CRP-Synthese untersucht werden.

Hierfür erfolgte ein Knockdown der beiden Isoformen durch small-interfering RNA in den HepG2-ABEK14-Zellen. Nach Stimulation mit dem PKC-Aktivator PDBu erfolgte eine Luziferase-Assay-Messung der CRP-Promoter-Aktivität im Vergleich zu untransfizierten Zellen (NT).
Für die Proteinkinase C δ konnte im Vergleich zu den nichttransfizierten Zellen eine signifikant erniedigte CRP-Promoteraktivität nachgewiesen werden, so dass von einer Beteiligung an der CRP-Synthese ausgegangen werden muss. Auch für die Proteinkinase ε zeigte sich eine hochsignifikante Reduktion ihrer Aktivität nach Behandlung mit siRNA.

Es zeigte sich in allen Versuchen in denen die Zellen mit siRNA transfiziert wurden eine erniedrigte CRP-Promoteraktivität im Vergleich zu den Zellen, die mit der Negativkontrolle behandelt wurden. In allen transifizierten Zellen zeigte wiederum eine etwas gesteigerte CRP-Promoteraktivität im Vergleich zu nicht-transifizierten Zellen. Dies war unabhängig von den Bedingungen der Versuchsdurchführung. Um mögliche Proteinmengenunterschiede auszuschließen erfolgte eine rechnerische Standardisierung der gemessenen CRP-Promoteraktivität auf eine feste Standardproteinmenge durch Bestimmung der Proteinmenge vor der jeweiligen Messung im Luziferase Assay. Wie vom Hersteller empfohlen wurde die niedrigstmögliche siRNA-Konzentration angewandt um den gewünschten Knockdown zu erreichen. Rückstände von Transfektionsreagenzien wurden, soweit möglich, durch Waschen mit PBS und Versetzen mit neuem Kultivierungsmedium nach Transfektion entfernt. Kinetische Effekte wurden beachtet, so dass eine Messung der Reduktion der Proteinmenge im Western-Blot erst nach 96 Stunden erfolgt ist. Eine Negativkontrolle mit STEALTH™ RNAi siRNA, eine siRNA ohne Sequenzhomologien in Säugetierzellen, war erfolgt und zeigte ebenfalls durchgängig und reproduzierbar erhöhte Werte im Luziferase Assay, d.h. eine erhöhte Aktivität des CRP-Promoters. Es ist davon auszugehen dass die Transfektion von siRNA in HepG2-ABEK14-Zellen per se methodisch bedingt zu einer gesteigerten CRP-Promoteraktivität führt. Der Mechanismus ist unbekannt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die PKC δ und ε an der CRP-Synthese in HepG2-ABEK14-Zellen beteiligt sind. Hier besteht ein möglicher Ansatzpunkt für

zukünftige medikamentöse Therapien. Die in dieser Arbeit angewendete Technik der RNA-Interferenz wäre für weitere Studien auch auf den Menschen anwendbar.

Zusätzlich sollten aber die unspezifischen methodischen Artefakte einer geringen Erhöhung der CRP-Promoteraktivität durch Transfektion wie z.B. Manipulation, Reagenzien, unspezifische Zellschäden, Toxizität untersucht werden. Hierfür würde sich z.B. eine Versuchsreihe mit den Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) Hasen anbieten [122]. Hasen scheinen sich aufgrund ihrer biologischen Eigenschaften, besser als Mäuse für Versuche zu CRP und Arteriosklerose zu eignen. So weiß man, dass sich die biologische Funktion von CRP in Menschen und Hasen im Gegensatz zu Mäusen und Ratten sehr ähnelt [154]. So ist z.B. das CRP in Mäusen kein Akute-Phase-Protein und wird auch nur in geringen Mengen gebildet.

4.4. Thrombin, ein Stimulator der Capsel-reaktives Protein-Synthese?

Es sollte in dieser Versuchsreihe untersucht werden, ob Thrombin als möglicher physiologischer Induktor der CRP-Synthese ein therapeutisches Ziel darstellt. Thrombin ist eine Serin-Protease die in inaktiver Form als Prothrombin vorliegt. Im Rahmen von z.B. Infekten steigt ihre Aktivität an [121]. In Arbeiten wurde bereits über einen positiven Effekt der Hemmung des Thrombins auf das Infektgeschehen berichtet [106]. Hier steht besonders das Protein C mit der Hemmung des Faktors Va und der daraus resultierenden Hemmung der Umwandlung des Prothrombin in das aktive Thrombin im Vordergrund [6]. Weiterhin konnten Thrombinrezeptoren auf der Oberfläche von primären humanen Hepatozyten nachgewiesen werden [86]. Aus diesen Gründen wäre eine Involvierung in die CRP-Synthese denkbar und würde einen eleganten Angriffspunkt zur Hemmung der CRP-Synthese darstellen, da es bereits eine Vielzahl kommerziell erhältlicher Thrombininhibitoren im klinischen Einsatz gibt.

In den Stimulationsversuchen mit Thrombin kam es zu keinem signifikanten Ansteigen der CRP-Promoter-Aktivität in HepG2-ABEK14-Zellen. Wie oben bereits beschrieben unterscheiden sich die Hepatom-Zellen trotz großer Ähnlichkeiten von

den PHH. Es ist bekannt, dass HepG2-Zellen Thrombinrezeptoren exprimieren und durch Aktivierung intrazelluläre Kaskaden ausgelöst werden können [93]. Ob die Effekte der aktivierten Thrombin-Rezeptoren in HepG2-ABEK14-Zellen auch auf humane Leberzellen übertragbar sind muss in weiteren Versuchen geklärt werden.

5 Zusammenfassung

Die Arteriosklerose und ihre Folgeerkrankungen sind für über 50% aller Todesfälle weltweit verantwortlich. Erkrankungen wie z.B. arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie und Diabetes mellitus sind als Risikofaktoren eindeutig belegt und etabliert.
Seit Jahrzehnten bestehen kontroverse Meinungen bezüglich der Beteiligung des CRP an der Arteriosklerose. Ist es ein reiner Risikomarker ohne direkten Einfluss oder doch ein kausaler Spieler, d.h. ein Risikofaktor. Mehrere Studien bestätigten einen hohen prädiktiven Wert für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse bei erhöhten hsCRP-Werten im oberen Drittel des Normbereichs. Trotz Indizien konnte eine kausale Beteiligung bisher aber nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden. So konnte CRP gemeinsam mit Komplement in den Wänden arteriosklerotischer Läsionen nachgewiesen werden. CRP ist weiterhin in der Lage Komplement zu aktivieren welches wiederum durch Freisetzung von Chemokinen zur Proliferation von SMC führen kann. Ein weiterer Hinweis für eine mögliche kausale Beteiligung des CRP an der Arteriosklerose ist seine Eigenschaft, die Schaumzellbildung aus Monozyten, durch Opsonierung des LDLs zur besseren Aufnahme, zu fördern.

In dieser Arbeit wurde versucht, eine hepatische CRP-Synthese-Hemmung über den Knockdown der Proteinkinase C zu erreichen. Aufgrund der vielfältigen und noch nicht vollständig bekannten Wirkungen bzw. Interaktionen des CRPs erschien eine Hemmung der Synthese in der Leber am sinnvollsten und einfachsten durchführbar.
Die Beteiligung der Proteinkinase C an der Synthese des C-reaktiven Proteins ist bekannt. Mit Hilfe der Methode der RNA-Interferenz zum Knockdown der PKC-Isoformen δ und ε sollte ihre Beteiligung am Syntheseweg eruiert und ein möglicher medikamentöser Ansatzpunkt untersucht werden. Als Zellreihe dienten HepG2-ABEK14-Zellen. Sie sind eine stabil mit einem 1kbp CRP Promotorkonstrukt und dem Luciferase Gen transfizierte Hepatoma-Zelllinie.
Es zeigte sich in den Versuchen eine signifikant verminderte Aktivität der CRP-Promoter-Aktivität in HepG2-ABEK14-Zellen nach Gen-silencing der Proteinkinasen δ und ε. Dieser vielversprechende medikamentöse Ansatz muss weiter untersucht werden.

Es ist bekannt, dass Thrombin in der akuten Phase vermehrt gebildet wird und evtl. eine stimulierende Wirkung auf die CRP-Synthese hat. Durch die bereits kommerziell verfügbaren Thrombininhibitoren wäre hier ein interessanter Ansatzpunkt gegeben. Nach Stimulation mit Thrombin wurde in den HepG2-ABEK14-Zellen keine signifikante Steigerung der CRP-Promoteraktivität erreicht. Eine medikamentöse Hemmung von Thrombin zur Senkung der CRP-Spiegel erscheint damit nicht sinnvoll zu sein. Es ist jedoch zu beachten, dass die Versuche an einer mit CRP-Luziferase stabil transifizierte Hepatom-Zelllinie durchgeführt wurden. Diese sind PHH in Struktur, Form, Syntheseapparat und Eigenschaften sehr ähnlich, jedoch nicht identisch. Auch bestehen Unterschiede der HepG2-ABEK14-Zellen und PHH gegenüber den Leberzellen in vivo. Es müssen weitere Studien erfolgen, die diese Unterschiede berücksichtigen.

6 Literaturverzeichnis

1
Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohmmed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK: RNA interference: biology, mechanism, and applications. Microbiol Mol Biol Rev 67: 657-85 (2003)

2
Allgaier C, Hertting G: Polymyxin B, a selective inhibitor of protein kinase C, diminishes the release of noradrenaline and the enhancement of release caused by phorbol 12,13-butyrate. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol 334: 218-221 (1986)

3
Anitschkow N, Chalatow S: Classics in arteriosclerosis research: On experimental cholesterin steatosis and its significance in the origin of some pathological processes. Arteriosclerosis 3: 178-82 (1913)

4
Aravin AA, Hannon GJ, Brennecke J: The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. Science 318: 761-764 (2007)

5
Behn-Krappa A, Newton AC: The hydrophobic phosphorylation motif of conventional protein kinase C is regulated by autophosphorylation. Curr Biol 9: 728-37 (1999)

6
Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ Jr: Recombinant human protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis (PROWESS) study group. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. N Engl J Med 344: 699-709 (2001)

7
Bhakdi S, Dorweiler B, Kirchmann R, Torzewski J, Weise E, Tranum-Jensen J, Walev I, Wieland E: On the pathogenesis of atherosclerosis: enzymatic transformation of human low density lipoprotein to an atherogenic moiety. J Exp Med 182: 1959-71 (1995)

8
Bhakdi S, Torzewski M, Klouche M, Hemmes M: Complement and atherogenesis: binding of CRP to degraded, nonoxidized LDL enhances complement activation. Arterioscler Thromb Vasc Biol 19: 2348-54 (1999)

9
Bharadwaj D, Stein MP, Volzer M, Mold C, Du Clos TW. The major receptor for C-reactive protein on leukocytes is fcgamma receptor II. J Exp Med 190: 585-90 (1990)

10
Black JD: Protein kinase C-mediated regulation of the cell cycle. Front Biosci 5: 406-23 (2000)

11
Boekholdt SM, Hack CE, Sandhu MS, Luben R, Bingham SA, Wareham NJ, Peters RJ, Jukema JW, Day NE, Kastelein JJ, Khaw KT: C-reactive protein levels and coronary artery disease incidence and mortality in apparently healthy men and women: the EPIC-Norfolk prospective population study 1993-2003. Atherosclerosis 187: 415-22 (2006)

12
Borkhardt A: Blocking oncogenes in malignant cells by RNA interference - new hope for a highly specific cancer treatment? Cancer Cell 2: 167-8 (2002)

13
Brass LF: Thrombin and platelet activation. Chest 124: 18-25 (2003)

14
Brass LF, Manning DR, Cichowski K, Abrams CS: Signaling through G proteins in platelets: to the integrins and beyond. Thromb Haemost 78: 581-9 (1997)

15
Brown MS, Goldstein JL: Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. Proc Natl Acad Sci USA 76: 3330-7 (1979)

16
Brown MS, Goldstein JL: Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. Annu Rev Biochem 52: 223-61 (1983)

17
Brown MS, Goldstein JL: A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science 232: 34-47 (1986)

18
C Reactive Protein Coronary Heart Disease Genetics Collaboration (CCGC), Wensley F, Gao P, Burgess S, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Shah T, Engert JC, Clarke R, Davey-Smith G, Nordestgaard BG, Saleheen D, Samani NJ, Sandhu M, Anand S, Pepys MB, Smeeth L, Whittaker J, Casas JP, Thompson SG, Hingorani AD, Danesh J. Association between C reactive protein and coronary heart disease: mendelian randomisation analysis based on individual participant data. BMJ 342: 548 (2011)

19
Calabró P, Willerson JT, Yeh ET: Inflammatory cytokines stimulated C-reactive protein production by human coronary artery smooth muscle cells. Circulation 108: 1930-2 (2003)

20
Calver A, Collier J, Vallance P: Nitric oxide and cardiovascular control. Exp Physiol 78: 303-26 (1993)

21
Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y: Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. J Biol Chem 257: 7847-51 (1982)

22
Chang MK, Binder CJ, Torzewski M, Witztum JL: C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: Phosphorylcholine of oxidized phospholipids. Proc Natl Acad Sci USA 99: 13043-8 (2002)

23
Chou MM, Hou W, Johnson J, Graham LK, Lee MH, Chen CS, Newton AC, Schaffhausen BS, Toker A: Regulation of protein kinase C zeta by PI 3-kinase and PDK-1. Curr Biol 8: 1069-77 (1998)

24
Coburn GA, Cullen BR: Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference. J Virol 76: 9225-31 (2002)

25
Coughlin SR: Protease-activated receptors and platelet function. Thromb Haemost 82: 353-6 (1999)

26
Coussens L, Rhee L, Parker PJ, Ullrich A: Alternative splicing increases the diversity of the human protein kinase C family. DNA 6: 389-94 (1987)

27
Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, Eda S, Eiriksdottir G, Rumley A, Lowe GD, Pepys MB, Gudnason V: C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. N Engl J Med 350: 1387-97 (2004)

28
Dawber TR, Meadors GF, Moore FE Jr: Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham Study. Am J Public Health Nations Health. 3: 279-81 (1951)

29
De Beer FC, Soutar AK, Baltz ML, Trayner IM, Feinstein A, Pepys MB: Low density lipoprotein and very low density lipoprotein are selectively bound by aggregated C-reactive protein. J Exp Med 156: 230-42 (1982)

30
de Lorgeril M, Salen P, Abramson J, Dodin S, Hamazaki T, Kostucki W, Okuyama H, Pavy B, Rabaeus M: Cholesterol lowering, cardiovascular diseases, and the rosuvastatin-JUPITER controversy: a critical reappraisal. Arch Intern Med 170: 1032-6 (2010)

31
Devaraj S, Dasu MR, Singh U, Rao LV, Jialal I: C-reactive protein stimulates superoxide anion release and tissue factor activity in vivo. Atherosclerosis 203: 67-74 (2009)

32
Diaz-Ricart M, Fuste B, Estebanell E, Tonda R, Lozano M, Escolar G, Jamieson G, Ordinas A: Efficient tyrosine phosphorylation of proteins after activation of platelets with thrombin depends on intact glycoprotein Ib. Platelets 16: 453-61 (2005)

33
Du Clos TW, Zlock LT, Marnell L: Definition of a C-reactive protein binding determinant on histones. J Biol Chem 266: 2167-71 (1991)

34
Dutil EM, Toker A, Newton AC: Regulation of conventional protein kinase C isozymes by phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK-1). Curr Biol 8: 1366-75 (1998)

35
Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T: Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature 411: 494-8 (2001)

36
Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T: RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. Genes Dev 15: 188-200 (2001)

37
Elliott P, Chambers JC, Zhang W, Clarke R, Hopewell JC, Peden JF, Erdmann J, Braund P, Engert JC, Bennett D, Coin L, Ashby D, Tzoulaki I, Brown IJ, Mt-Isa S, McCarthy MI, Peltonen L, Freimer NB, Farrall M, Ruokonen A, Hamsten A, Lim N, Froguel P, Waterworth DM, Vollenweider P, Waeber G, Jarvelin MR, Mooser V, Scott J, Hall AS, Schunkert H, Anand SS, Collins R, Samani NJ, Watkins H, Kooner JS. Genetic Loci associated with C-reactive protein levels and risk of coronary heart disease. JAMA 302: 37-48 (2009)

38
Enocsson H, Sjöwall C, Skogh T, Eloranta ML, Rönnblom L, Wetterö J: Interferon-alpha mediates suppression of C-reactive protein: explanation for muted C-reactive protein response in lupus flares? Arthritis Rheum 60: 3755-60 (2009)

39
Fehsel K, Plewe D, Kolb-Bachofen V: Nitric oxide-induced expression of C-reactive protein in islet cells as a very early marker for islet stress in the rat pancreas. Nitric Oxide 1: 254-62 (1997)

40
Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N: Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? Nat Rev Genet 9: 102-114 (2008)

41
Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature 391: 806-11 (1998)

42
Förstermann U, Nakane M, Tracey WR, Pollock JS: Isoforms of nitric oxide synthase: functions in the cardiovascular system. Eur Heart J 14 Suppl I: 10-5 (1993)

43
Fu T, Borensztajn J: Macrophage uptake of low-density lipoprotein bound to aggregated C-reactive protein: possible mechanism of foam-cell formation in atherosclerotic lesions. Biochem J 366: 195-201 (2002)

44
Gabay C, Kushner I: Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. N Engl J Med 340: 448-54 (1999)

45
Geary RS, Baker BF, Crooke ST. Clinical and preclinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of mipomersen (kynamro(®)): a second-generation antisense oligonucleotide inhibitor of apolipoprotein B. Clin Pharmacokinet 54: 133-46 (2015)

46
Genest J, McPherson R, Frohlich J, Anderson T, Campbell N, Carpentier A, Couture P, Dufour R, Fodor G, Francis GA, Grover S, Gupta M, Hegele RA, Lau DC, Leiter L, Lewis GF, Lonn E, Mancini GB, Ng D, Pearson GJ, Sniderman A, Stone JA, Ur E: 2009 Canadian Cardiovascular Society/Canadian guidelines for the diagnosis and treatment of dyslipidemia and prevention of cardiovascular disease in the adult - 2009 recommendations. Can J Cardiol 25: 567-79 (2009)

47
Ghosh S, Karin M: Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. Cell 109: 81-96 (2002)

48
Goldberg MA, Glass GA, Cunningham JM, Bunn HF: The regulated expression of erythropoietin by two human hepatoma cell lines. Proc Natl Acad Sci USA 84: 7972-6 (1987)

49
Gould JM, Weiser JN: Expression of C-reactive protein in the human respiratory tract. Infect Immun 69: 1747-54 (2001)

50
Hack CE, Wolbink GJ, Schalkwijk C, Speijer H, Hermens WT, van den Bosch H: A role for secretory phospholipase A2 and C-reactive protein in the removal of injured cells. Immunol Today 18: 111-5 (1997)

51
Hage FG, Oparil S, Xing D, Chen YF, McCrory MA, Szalai AJ. C-reactive protein-mediated vascular injury requires complement. Arterioscler Thromb Vasc Biol 30: 1189-95 (2010)

52
Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B: Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. Proc Natl Acad Sci USA 72: 2994-8 (1975)

53
Hansson GK, Robertson AK, Söderberg-Nauclér C: Inflammation and atherosclerosis. Annu Rev Pathol 1: 297-329 (2006)

54
Harris AJ, Dial SL, Casciano DA: Comparison of basal gene expression profiles and effects of hepatocarcinogens on gene expression in cultured primary human hepatocytes and HepG2 cells. Mutat Res 18: 79-99 (2004)

55
Haust MD: Arterial endothelium and its potentials. Adv Exp Med Biol 82: 34-51 (1977)

56
Haverkate F, Thompson SG, Pyke SD, Gallimore JR, Pepys MB: Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. Lancet 349: 462-6 (1997)

57
Haycraft JB: Über die Einwirkung eines Sekretes des officinellen Blutegels auf die Gerinnbarkeit des Bluts. Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmakol 18: 209–217 (1894)

58
Hirschfield GM, Pepys MB: C-reactive protein and cardiovascular disease: new insights from an old molecule. QJM 96: 793-807 (2003)

59
Hollenberg MD, Compton SJ: International Union of Pharmacology. XXVIII. Proteinase-activated receptors. Pharmacol Rev 54: 203-17 (2002)

60
Hori T, Takai Y, Takahashi T: Presynaptic mechanism for phorbol ester-induced synaptic potentiation. J Neurosci 19:7262-7 (1999)

61
Inoue M, Kishimoto A, Takai Y, Nishizuka Y: Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain. J Biol Chem 252: 7610-6 (1977)

62
Itaya H, Imaizumi T, Yoshida H, Koyama M, Suzuki S, Satoh K. Expression of vascular endothelial growth factor in human monocyte/macrophages stimulated with lipopolysaccharide. Thromb Haemost 85: 171-6 (2001)

63
Ivashchenko Y, Kramer F, Schäfer S, Bucher A, Veit K, Hombach V, Busch A, Ritzeler O, Dedio J, Torzewski J: Protein kinase C pathway is involved in transcriptional regulation of C-reactive protein synthesis in human hepatocytes. Arterioscler Thromb Vasc Biol 25: 186-92 (2005)

64
Jabs WJ, Theissing E, Nitschke M, Bechtel JF, Duchrow M, Mohamed S, Jahrbeck B, Sievers HH, Steinhoff J, Bartels C: Local generation of C-reactive protein in diseased coronary artery venous bypass grafts and normal vascular tissue. Circulation 108: 1428-31 (2003)

65
Jialal I, Devaraj S, Smith G, Lam KS, Kumaresan PR: A novel peptide inhibitor attenuates C-reactive protein's pro-inflammatory effects in-vivo. Int J Cardiol 168: 3909-12 (2013)

66
Jones NR, Pegues MA, McCrory MA, Singleton W, Bethune C, Baker BF, Norris DA, Crooke RM, Graham MJ, Szalai AJ: A Selective Inhibitor of Human C-reactive Protein Translation Is Efficacious In Vitro and in C-reactive Protein Transgenic Mice and Humans. Mol Ther Nucleic Acids 13: 52 (2012)

67
Jorgensen R: Altered gene expression in plants due to trans interactions between homologous genes. Trends Biotechnol 8: 340-344 (1990)

68
Kaplan MH, Volanakis JE: Interaction of C-reactive protein complexes with the complement system. I. Consumption of human complement associated with the reaction of C-reactive protein with pneumococcal C-polysaccharide and with the choline phosphatides, lecithin and sphingomyelin. J Immunol 112: 2135-47 (1974)

69
Keaney J, Campbell M, Humphries P: From RNA interference technology to effective therapy: how far have we come and how far to go? Ther Deliv 2: 1395-406 (2011)

70
Kindmark CO: Stimulating effect of C-reactive protein on phagocytosis of various species of pathogenic bacteria. Clin Exp Immunol 8: 941-8 (1971)

71
Kleemann R, Gervois PP, Verschuren L, Staels B, Princen HM, Kooistra T: Fibrates down-regulate IL-1-stimulated C-reactive protein gene expression in hepatocytes by reducing nuclear p50-NFkappa B-C/EBP-beta complex formation. Blood 101: 545-51 (2003)

72
Knowles BB, Aden DP: Human hepatoma derived cell line, process for preparation therof, and uses thereof. U. S. Pat. 4,393,133 (1983)

73
Knowles BB, Howe CC, Aden DP: Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. Science 209: 497-9 (1980)

74
Koenig W, Khuseyinova N: Biomarkers of atherosclerotic plaque instability and rupture. Arterioscler Thromb Vasc Biol 27: 15-26 (2007)

75
Koenig W, Löwel H, Baumert J, Meisinger C: C-reactive protein modulates risk prediction based on the Framingham Score: implications for future risk assessment: results from a large cohort study in southern Germany. Circulation 109: 1349-53 (2004)

76
Kolb-Bachofen V, Puchta-Teudt N, Egenhofer C: Expression of membrane-associated C-reactive protein by human monocytes: indications for a selectin-like activity participating in adhesion. Glycoconj J 12: 122-7 (1995)

77
Kolkhof P, Geerts A, Schäfer S, Torzewski J: Cardiac glycosides potently inhibit C-reactive protein synthesis in human hepatocytes. Biochem Biophys Res Commun 394: 233-9 (2010)

78
Kruth HS, Jones NL, Huang W, Zhao B, Ishii I, Chang J, Combs CA, Malide D, Zhang WY: Macropinocytosis is the endocytic pathway that mediates macrophage foam cell formation with native low density lipoprotein. J Biol Chem 280: 2352-60 (2005)

79
Kuta AE, Baum LL: C-reactive protein is produced by a small number of normal human peripheral blood lymphocytes. J Exp Med 164: 321-6 (1986)

80
Le Good JA, Ziegler WH, Parekh DB, Alessi DR, Cohen P, Parker PJ: Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. Science 281: 2042-5 (1998)

81
Lewis BE, Wallis DE, Berkowitz SD, Matthai WH, Fareed J, Walenga JM, Bartholomew J, Sham R, Lerner RG, Zeigler ZR, Rustagi PK, Jang IK, Rifkin SD, Moran J, Hursting MJ, Kelton JG: Argatroban anticoagulant therapy in patients with heparin-induced thrombocytopenia. Circulation 103: 1838 –1843 (2001)

82
Li SP, Goldman ND: Regulation of human C-reactive protein gene expression by two synergistic IL-6 responsive elements. Biochemistry 35: 9060-8 (1996)

83
Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, Grillo RL, Rebuzzi AG, Pepys MB, Maseri A: The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. N Engl J Med 331: 417-24 (1994)

84
Lu J, Marjon KD, Mold C, Du Clos TW, Sun PD. Pentraxins and Fc receptors. Immunol Rev 250: 230-8 (2012)

85
Lundblad RL, White GC: The interaction of thrombin with blood platelets. Platelets 16: 373-85 (2005)

86
Maekawa H, Tollefsen DM: Role of the proposed serpin-enzyme complex receptor recognition site in binding and internalization of thrombin-heparin cofactor II complexes by hepatocytes. J Biol Chem 271: 18604-9 (1996)

87
Mahmood SS, Levy D, Vasan RS, Wang TJ: The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: a historical perspective. Lancet 383: 999-1008 (2013)

88
Majello B, Arcone R, Toniatti C, Ciliberto G: Constitutive and IL-6-induced nuclear factors that interact with the human C-reactive protein promoter. EMBO J 9: 457-65 (1990)

89
Manolov DE, Röcker C, Hombach V, Nienhaus GU, Torzewski J: Ultrasensitive confocal fluorescence microscopy of C-reactive protein interacting with FcgammaRIIa. Arterioscler Thromb Vasc Biol 24: 2372-7 (2004)

90
Maraganore JM, Bourdon P, Jablonski J, Ramachandran KL, Fenton JW: Design and characterization of hirulogs: a novel class of bivalent peptide inhibitors of thrombin. Biochemistry 29: 7095–7101 (1990)

91
Martinez J, Patkaniowska A, Elbashir SM, Harborth J, Hossbach M, Urlaub H, Meyer J, Weber K, Vandenburgh K, Manninga H, Scaringe SA, Luehrmann R, Tuschl T: Analysis of mammalian gene function using small interfering RNAs. Nucleic Acids Res Suppl. 3: 333 (2003)

92
McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Böhm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Køber L, Lip GY, Maggioni AP, Parkhomenko A, Pieske BM, Popescu BA, Rønnevik PK, Rutten FH, Schwitter J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade PT, Voors AA, Zannad F, Zeiher A: ESC Committee for Practice Guidelines. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. Eur Heart J 33: 1787-847 (2012)

93
Mitsui H, Maruyama T, Kimura S, Takuwa Y: Thrombin activates two stress-activated protein kinases, c-Jun N-terminal kinase and p38, in HepG2 cells. Hepatology 27: 1362-7 (1998)

94
Mold C, Gewurz H, Du Clos TW: Regulation of complement activation by C-reactive protein. Immunopharmacology 42: 23-30 (1999)

95
Morley JJ, Kushner I: Serum C-reactive protein levels in disease. Ann N Y Acad Sci 389: 406-18 (1982)

96
Moscat J, Diaz-Meco MT, Rennert P: NF-kappaB activation by protein kinase C isoforms and B-cell function. EMBO Rep 4: 31-6 (2003)

97
Mueller J: C-reaktives Protein und Atherogenese – Untersuchungen zum Proteinkinase-C-abhängigen Syntheseweg des C-reaktiven Proteins in Leberzellen. Med Dissertation, Universität Ulm (2008)

98
Murphy TM, Baum LL, Beaman KD: Extrahepatic transcription of human C-reactive protein. J Exp Med 173: 495-8 (1991)

99
Newby AC, Zaltsman AB: Fibrous cap formation or destruction--the critical importance of vascular smooth muscle cell proliferation, migration and matrix formation. Cardiovasc Res 41: 345-60 (1999)

100
Newton AC: Regulation of protein kinase C. Curr Opin Cell Biol 9: 161-7 (1997)

101
Niculescu F, Badea T, Rus H: Sublytic C5b-9 induces proliferation of human aortic smooth muscle cells: role of mitogen activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. Atherosclerosis 142: 47-56 (1999)

102
Osterud B, Bjorklid E: Role of monocytes in atherogenesis. Physiol Rev 83: 1069-112 (2003)

103
Nykänen A, Haley B, Zamore PD: ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. Cell 107: 309-21 (2001)

104
Pasceri V, Cheng JS, Willerson JT, Yeh ET: Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs. Circulation 103: 2531-4 (2001)

105
Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET: Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. Circulation 102: 2165-8 (2000)

106
Penn MS, Kamath M: Novel mechanisms for maintaining endothelial barrier function in sepsis. Circulation 126: 2677-9 (2012)

107
Pepys MB, Hirschfield GM, Tennent GA, Gallimore JR, Kahan MC, Bellotti V, Hawkins PN, Myers RM, Smith MD, Polara A, Cobb AJ, Ley SV, Aquilina JA, Robinson CV, Sharif I, Gray GA, Sabin CA, Jenvey MC, Kolstoe SE, Thompson D, Wood SP: Targeting C-reactive protein for the treatment of cardiovascular disease. Nature 440: 1217-21 (2006)

108
Pepys MB, Rowe IF, Baltz ML: C-reactive protein: binding to lipids and lipoproteins. Int Rev Exp Pathol 27: 83-111 (1985)

109
Reynolds GD, Vance RP. C-reactive protein immunohistochemical localization in normal and atherosclerotic human aortas. Arch Pathol Lab Med 111: 265-9 (1987)

110
Ribbert, H: Ueber die Genese der arteriosklerotischen Veränderungen der Intima. Verhandlungen der Deutschen Pathologischen Gesellschaft 8: 168-177 (1905)

111
Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH: Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. N Engl J Med 336: 973-9 (1997)

112
Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM Jr, Kastelein JJ, Koenig W, Libby P, Lorenzatti AJ, MacFadyen JG, Nordestgaard BG, Shepherd J, Willerson JT, Glynn RJ; JUPITER Study Group: Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. N Engl J Med 359: 2195-207 (2008)

113
Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N: C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. N Engl J Med 342: 836-43 (2000)

114
Ridker PM, MacFadyen JG, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM, Kastelein JJ, Koenig W, Libby P, Lorenzatti AJ, Nordestgaard BG, Shepherd J, Willerson JT, Glynn RJ; JUPITER Study Group: Number needed to treat with rosuvastatin to prevent first cardiovascular events and death among men and women with low low-density lipoprotein cholesterol and elevated high-sensitivity C-reactive protein: justification for the use of statins in prevention: an intervention trial evaluating rosuvastatin (JUPITER). Circ Cardiovasc Qual Outcomes 2: 616-23 (2009)

115
Ridker PM, Macfadyen JG, Nordestgaard BG, Koenig W, Kastelein JJ, Genest J, Glynn RJ: Rosuvastatin for primary prevention among individuals with elevated high-sensitivity c-reactive protein and 5% to 10% and 10% to 20% 10-year risk. Implications of the Justification for Use of Statins in Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin (JUPITER) trial for "intermediate risk". Circ Cardiovasc Qual Outcomes 3: 447-52 (2010)

116
Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR: Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. N Engl J Med 347: 1557-65 (2002)

117
Romano N, Macino G: Quelling: transient inactivation of gene expression in Neurospora crassa by transformation with homologous sequences. Mol Microbiol 6: 3343-53 (1992)

118
Ross R, Glomset J, Harker L: Response to injury and atherogenesis. Am J Pathol 86: 675-84 (1977)

119
Rowe IF, Soutar AK, Trayner IM, Baltz ML, de Beer FC, Walker L, Bowyer D, Herbert J, Feinstein A, Pepys MB: Rabbit and rat C-reactive proteins bind apolipoprotein B-containing lipoproteins. J Exp Med 159: 604-16 (1984)

120
Schettler G, Mörl H: Ätiologie und Pathogenese der Arteriosklerose. Naturwissenschaften 65: 130-136 (1978)

121
Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, van der Poll T: Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. J Leukoc Biol 83: 536-45 (2008)

122
Shiomi M, Koike T, Ito T: Contribution of the WHHL rabbit, an animal model of familial hypercholesterolemia, to elucidation of the anti-atherosclerotic effects of statins. Atherosclerosis 231: 39-47 (2013)

123
Shlomai A, Shaul Y: Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference. Hepatology 37: 764-70 (2003)

124
Shrive AK, Cheetham GM, Holden D, Myles DA, Turnell WG, Volanakis JE, Pepys MB, Bloomer AC, Greenhough TJ: Three dimensional structure of human C-reactive protein. Nat Struct Biol 3: 346-54 (1996)

125
Silva JM, Hammond SM, Hannon GJ: RNA interference: a promising approach to antiviral therapy? Trends Mol Med 8: 505-8 (2002)

126
Singh U, Dasu MR, Yancey PG, Afify A, Devaraj S, Jialal I: Human C-reactive protein promotes oxidized low density lipoprotein uptake and matrix metalloproteinase-9 release in Wistar rats. J Lipid Res 49: 1015-23 (2008)

127
Sledz CA, Williams BR: RNA interference in biology and disease. Blood 106: 787-94 (2005)

128
Smith GD, Ebrahim S. 'Mendelian randomization': can genetic epidemiology contribute to understanding environmental determinants of disease? Int J Epidemiol 32: 1-22 (2003)

129
Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M: Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. Proc Natl Acad Sci USA 92: 8264-8 (1995)

130
Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD: How cells respond to interferons. Annu Rev Biochem 67: 227-64 (1998)

131
Stary HC: Composition and classification of human atherosclerotic lesions. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 421: 277-90 (1992)

132
Stary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, Glagov S, Insull W Jr, Richardson M, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, et al.: A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Circulation 85: 391-405 (1992)

133
Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW: A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Circulation 92: 1355-74 (1995)

134
Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW: A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Circulation 89: 2462-78 (1994)

135
Stein EA, Dufour R, Gagne C, Gaudet D, East C, Donovan JM, Chin W, Tribble DL, McGowan M: Apolipoprotein B synthesis inhibition with mipomersen in heterozygous familial hypercholesterolemia: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial to assess efficacy and safety as add-on therapy in patients with coronary artery disease. Circulation 126: 2283-92 (2012)

136
Stein MP, Mold C, Du Clos TW. C-reactive protein binding to murine leukocytes requires Fc gamma receptors. J Immunol 2000 164: 1514-20 (2000)

137
Su TT, Guo B, Kawakami Y, Sommer K, Chae K, Humphries LA, Kato RM, Kang S, Patrone L, Wall R, Teitell M, Leitges M, Kawakami T, Rawlings DJ: PKC-beta controls I kappa B kinase lipid raft recruitment and activation in response to BCR signaling. Nat Immunol 3: 780-6 (2002)

138
Sun H, Zhang Y, Gao P, Li Q, Sun Y, Zhang J, Xu C: Adiponectin reduces C-reactive protein expression and downregulates STAT3 phosphorylation induced by IL-6 in HepG2 cells. Mol Cell Biochem 347: 183-9 (2011)

139
Szalai AJ, McCrory MA, Xing D, Hage FG, Miller A, Oparil S, Chen YF, Mazzone M, Early R, Henry SP, Zanardi TA, Graham MJ, Crooke RM: Inhibiting C-reactive protein for the treatment of cardiovascular disease: promising evidence from rodent models. Mediators Inflamm 2014:353614 (2014)

140
Tam OH, Aravin AA, Stein P, Girard A, Murchison EP, Cheloufi S, Hodges E, Anger M, Sachidanandam R, Schultz RM, Hannon GJ: Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. Nature 453: 534-538 (2008)

141
Taskinen S, Kovanen PT, Jarva H, Meri S, Pentikäinen MO: Binding of C-reactive protein to modified low-density-lipoprotein particles: identification of cholesterol as a novel ligand for C-reactive protein. Biochem J 367: 403-12 (2002)

142
Taylor AW, Ku NO, Mortensen RF: Regulation of cytokine-induced human C-reactive protein production by transforming growth factor-beta. J Immunol 145: 2507-13 (1990)

143
Taylor KE, Giddings JC, van den Berg CW. C-reactive protein-induced in vitro endothelial cell activation is an artefact caused by azide and lipopolysaccharide. Arterioscler Thromb Vasc Biol 25: 1225-30 (2005)

144
Thompson D, Pepys MB, Wood SP: The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. Structure 7: 169-77 (1999)

145
Tillett WS, Francis T: Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. J Exp Med 52: 561-71 (1930)

146
Toniatti C, Demartis A, Monaci P, Nicosia A, Ciliberto G: Synergistic trans-activation of the human C-reactive protein promoter by transcription factor HNF-1 binding at two distinct sites. EMBO J 9: 4467-75 (1990)

147
Torzewski J, Bowyer DE, Waltenberger J, Fitzsimmons C: Processes in atherogenesis: complement activation. Atherosclerosis 132: 131-8 (1997)

148
Torzewski M, Klouche M, Hock J, Messner M, Dorweiler B, Torzewski J, Gabbert HE, Bhakdi S: Immunohistochemical demonstration of enzymatically modified human LDL and its colocalization with the terminal complement complex in the early atherosclerotic lesion. Arterioscler Thromb Vasc Biol 18: 369-78 (1998)

149
Torzewski J, Li K, Zimmermann O: Road map to drug discovery and development – Inhibiting C-reactive protein for the treatment of cardiovascular disease. J Bioequiv Availab S1: 1-5 (2011)

150
Torzewski M, Rist C, Mortensen RF, Zwaka TP, Bienek M, Waltenberger J, Koenig W, Schmitz G, Hombach V, Torzewski J: C-reactive protein in the arterial intima: role of C-reactive protein receptor-dependent monocyte recruitment in atherogenesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 20: 2094-9 (2000)

151
Torzewski J, Oldroyd R, Lachmann P, Fitzsimmons C, Proudfoot D, Bowyer D: Complement-induced release of monocyte chemotactic protein-1 from human smooth muscle cells. A possible initiating event in atherosclerotic lesion formation. Arterioscler Thromb Vasc Biol 16: 673-7 (1996)

152
Torzewski J, Torzewski M, Bowyer DE, Fröhlich M, Koenig W, Waltenberger J, Fitzsimmons C, Hombach V: C-reactive protein frequently colocalizes with the terminal complement complex in the intima of early atherosclerotic lesions of human coronary arteries. Arterioscler Thromb Vasc Biol 18: 1386-92 (1998)

153
Torzewski M, Torzewski J, Bowyer DE, Waltenberger J, Fitzsimmons C, Hombach V, Gabbert HE: Immunohistochemical colocalization of the terminal complex of human complement and smooth muscle cell alpha-actin in early atherosclerotic lesions. Arterioscler Thromb Vasc Biol 17: 2448-52 (1997)

154
Torzewski M, Waqar AB, Fan J: Animal models of C-reactive protein. Mediators Inflamm 2014:683598 (2014)

155
Tuschl T, Borkhardt A: Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy. Mol Interv 2: 158-167 (2002)

156
Tuschl G, Hrach J, Walter Y, Hewitt PG, Mueller SO: Serum-free collagen sandwich cultures of adult rat hepatocytes maintain liver-like properties long term: a valuable model for in vitro toxicity and drug-drug interaction studies. Chem Biol Interact 181: 124-37 (2009)

157
Tuschl G, Mueller SO: Effects of cell culture conditions on primary rat hepatocytes-cell morphology and differential gene expression. Toxicology 218: 205-15 (2006)

158
Tuzcu EM, Kapadia SR, Tutar E, Ziada KM, Hobbs RE, McCarthy PM, Young JB, Nissen SE: High prevalence of coronary atherosclerosis in asymptomatic teenagers and young adults: evidence from intravascular ultrasound. Circulation 103: 2705-10 (2001)

159
Vallance P, Moncada S: Nitric oxide--from mediator to medicines. J R Coll Physicians Lond 28: 209-19 (1994)

160
van den Berg CW, Taylor KE, Lang D. C-reactive protein-induced in vitro vasorelaxation is an artefact caused by the presence of sodium azide in commercial preparations. Arterioscler Thromb Vasc Biol 24: 168-71 (2004)

161
Van Tits L, de Graaf J, Toenhake H, van Heerde W, Stalenhoef A: C-reactive protein and annexin A5 bind to distinct sites of negatively charged phospholipids present in oxidized low-density lipoprotein. Arterioscler Thromb Vasc Biol 25: 717-22 (2005)

162
Venugopal SK, Devaraj S, Yuhanna I, Shaul P, Jialal I: Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells. Circulation 106: 1439-41 (2002)

163
Verma S, Wang CH, Li SH, Dumont AS, Fedak PW, Badiwala MV, Dhillon B, Weisel RD, Li RK, Mickle DA, Stewart DJ: A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. Circulation 106: 913-9 (2002)

164
Volanakis JE: Complement activation by C-reactive protein complexes. Ann N Y Acad Sci 389: 235-50 (1982)

165
Volanakis JE: Human C-reactive protein: expression, structure, and function. Mol Immunol 38: 189-97 (2001)

166
Volanakis JE, Kaplan MH: Specificity of C-reactive protein for choline phosphate residues of pneumococcal C-polysaccharide. Proc Soc Exp Biol Med 136: 612-4 (1971)

167
Volanakis JE, Wirtz KW: Interaction of C-reactive protein with artificial phosphatidylcholine bilayers. Nature 281: 155-7 (1979)

168
Watanabe T, Totoki Y, Toyoda A, Kaneda M, Kuramochi-Miyagawa S, Obata Y, Chiba H, Kohara Y, Kono T, Nakano T, Surani MA, Sakaki Y, Sasaki H: Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. Nature 453: 539-543 (2008)

169
WHO: The European health report 2012: charting the way to well-being: 15-40 (2013). Online im Internet abrufbar: http://www.euro.who.int/en/data-and-evidence/european-health-report-2012 (Abrufdatum: 08.01.2015)

170
Willerson JT, Kereiakes DJ: Endothelial dysfunction. Circulation 108: 2060-1 (2003)

171
Wolbink GJ, Brouwer MC, Buysmann S, ten Berge IJ, Hack CE: CRP-mediated activation of complement in vivo: assessment by measuring circulating complement-C-reactive protein complexes. J Immunol 157: 473-9 (1996)

172
World Health Organization. Classification of atherosclerotic lesions: report of a study group. WHO Techn Rep Ser 143: 1-20 (1958)

173
Yanagita T, Kobayashi H, Yamamoto R, Takami Y, Yokoo H, Yuhi T, Nakayama T,Wada A: Protein kinase C and the opposite regulation of sodium channel alpha- and beta1-subunit mRNA levels in adrenal chromaffin cells. J Neurochem 73:1749-57 (1999)

174
Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL. Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques. Am J Pathol 158: 1039-51 (2001)

175
Yeh ET, Anderson HV, Pasceri V, Willerson JT: C-reactive protein: linking nflammation to cardiovascular complications. Circulation 104: 974-5 (2001)

176
Yeh CH, Hogg K, Weitz JI: Overview of the new oral anticoagulants: opportunities and challenges. Arterioscler Thromb Vasc Biol 35: 1056-65 (2015)

177
Yu Q, Liu Z, Waqar AB, Ning B, Yang X, Shiomi M, Graham MJ, Crooke RM, Liu E, Dong S, Fan J: Effects of antisense oligonucleotides against C-reactive protein on the development of atherosclerosis in WHHL rabbits. Mediators Inflamm 2014:979132 (2014)

178
Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP: RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. Cell 101: 25-33 (2000)

179
Zernecke A, Shagdarsuren E, Weber C: Chemokines in atherosclerosis: an update. Arterioscler Thromb Vasc Biol 28: 1897-908 (2008)

180
Zhang D, Sun M, Samols D, Kushner I: STAT3 participates in transcriptional activation of the C-reactive protein gene by interleukin-6. J Biol Chem 271: 9503-9 (1996)

181
Zwaka TP, Hombach V, Torzewski J: C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis. Circulation 103: 1194-7 (2001)

7 Danksagung

Danksagung aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

8 Lebenslauf

Lebenslauf aus Gründen des Datenschutzes entfernt.