

Universität Ulm
Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor Professor Dr. V. Hombach

**C-reaktives Protein und Atherogenese –
Untersuchungen zum Proteinkinase-C-abhängigen
Syntheseweg des C-reaktiven Proteins in
Leberzellen**

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

Johannes Müller

Würzburg

2008

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1.Gutachter: Prof. Dr. Jan Torzewski

2.Gutachter: PD Dr. Jochen Greiner

Tag der Promotion: 19.06.2008

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	II
1 Einleitung.....	1
1.1 Pathophysiologische Theorien zur Entstehung der Arteriosklerose	1
1.1.1 Proatherogene Effekte der Lipoproteine LDL und ox-LDL	2
1.2 C-reaktives Protein.....	3
1.2.1 C-reaktives Protein und Arteriosklerose.....	4
1.2.2 Synthese des C-reaktiven Proteins.....	5
1.2.3 Proteinkinase C.....	6
1.3 Strategien zur Blockade des atherogenen Effektes von CRP	10
2 Material und Methoden	14
2.1 Material	14
2.2 Methoden	17
2.2.1 Methoden zur Zellkultivierung	17
2.2.2 Transfektion von siRNA in ABEK14-Zellen	19
2.2.3 Stimulation von Leberzelllinien mit Zytokinen	20
2.2.4 Lyse von Leberzellen	21
2.2.5 Ermittlung des zellulären Eiweißgehaltes im Proteinassay	23
2.2.6 Western-Blot	25
2.2.7 ELISA.....	26
2.2.8 Luciferase Assay.....	28
2.2.9 Statistik	29
3 Ergebnisse.....	30
3.1 Expression von Isoformen der Proteinkinase C in PHH	30
3.2 Änderung der CRP-Synthese in PHH nach Stimulation mit Interleukinen..	31
3.3 Analyse der CRP-Promotoraktivität.....	33
4 Diskussion	36
4.1 CRP: Akute-Phase und atherogene Prozesse	36
4.2 Die hepatische CRP-Synthese – Möglichkeiten der Modulation	37
4.2.1 Der IL-1 und IL-6 -vermittelte pathway.....	37
4.2.2 PKC und CRP – neue Ansätze zum Verständnis des Synthesewegs	38
4.2.3 IL-8: Stimulator des PKC-vermittelten Synthesewegs?.....	39
5 Zusammenfassung.....	42
6 Literaturverzeichnis	44
7 Danksagung.....	51
8 Lebenslauf	52

Abkürzungsverzeichnis

ABEK-14	Transfizierte Hepatomzelllinie
AMP	Adenosinmonophosphat
aPKC	atypische Proteinkinase C
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	<i>Bicinchoninic Acid</i>
bp	Basenpaare
C1-C4	<i>Untereinheiten der Proteinkinase 1-4</i>
C/EBP	<i>CCAAT-Box/ Enhancer-Binding-Protein</i>
C5b-9	Komplementkomponenten C5b-C9
Ca ²⁺	Calciumionen
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CHAPS	3- [(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio] -l-Propansulfonsäure
Cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzenimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRP	C-reaktives Protein
cPKC	konventionelle Proteinkinase C
DAG	Diacylglycerol
dd H ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FCγRIIa	FC-Rezeptor Gamma RII –A
FCS	<i>Fetal calv serum</i>
G	Gramm
G418	Geneticin (Aminoglycosid-Antibiotikum)
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HepG2	Hepatomzelllinie G2
HRP	<i>Horse radish peroxid</i>
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
IL-1	Interleukin 1
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Media</i>
kDa	Kilodalton
KpnXhoI	<i>Restriktionsendonuklease KpnXhoI</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LF	Lipofectamin
LY33531	<i>Bisindolylmalmeid-Derivat Ly33531</i>
M	Molar
mA	Milliampere
MAK	Membran-Angriffskomplex

MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
Mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
Mg ²⁺	Magnesiumionen
Min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
MPS	Mononukleäres Phagozytierendes System
mV	Millivolt
N	Normal
neg.	Negativ
NET	<i>Ein Blockpuffer, enthält Leberextrakt</i>
NFκB	Nukleärer Faktor Kappa B
Ng	Nanogramm
Nm	Nanomol
NP-40	<i>Ein Lysepuffer</i>
nPKC	neue Proteinkinase C
NT	<i>non-treated</i> (unbehandelt)
O ₂	Sauerstoffmolekül
ox-LDL	oxidiertes <i>Low Density Lipoprotein</i>
p	Statistische Signifikanz
p50	<i>Untereinheit des nukleären Faktors kappa-B</i>
p65	<i>Untereinheit des nukleären Faktors kappa-B</i>
PAVK	Periphere Arterielle Verschlusskrankheit
pcDNA™	<i>Ein DNA-Vektor</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDBu	4α-Phorbol 12,13 Dibutyrat
pGL3	<i>Luciferase-Reporter Vektor</i>
PHH	Primäre humane Hepatozyten
PKC	Proteinkinase C
PKD	Proteinkinase D
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	Pyrophosphat
PSG	Penicillin/Streptomycin/L-Glutamin
RISC	<i>RNA Induced Silencing Complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	RNA-spaltendes Enzym
siRNA	<i>Small-Interfering Ribonukleinsäure</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TNFα	Tumor Nekrose Faktor α
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U/min	Umdrehungen/Minute
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>
Zn ²⁺	Zinkionen

1 Einleitung

1.1 Pathophysiologische Theorien zur Entstehung der Arteriosklerose

Die Arteriosklerose bezeichnet eine chronisch progrediente, generalisierte Erkrankung der Arterien, bei denen ein fibrinöser Umbau zu Verdickung, Verhärtung und Elastizitätsverlust der Gefäßwand führt. Laut WHO ist sie definiert als

variable Kombination von Intimaveränderungen, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia.

Erste Veränderungen der Gefäßwand beginnen bereits beim Jugendlichen, der Krankheitsprozess schreitet zunächst asymptomatisch über Jahrzehnte fort bis sich die Arteriosklerose in Form von Herzinfarkt, Schlaganfall und PAVK klinisch manifestiert. Die Arteriosklerose und ihre Folgeerkrankungen sind heute unverändert Ursache für über 50 % der Todesfälle in westlichen Ländern.

Zur Entstehung der Arteriosklerose tragen die klassischen Risikofaktoren wie Nikotinabusus, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie und arterielle Hypertonie bei. Auch wenn heute noch nicht alle komplexen Mechanismen der Entstehung der arteriosklerotischen Gefäßveränderungen und den damit verbundenen Folgeerkrankungen entschlüsselt sind, wird der Arteriosklerose pathophysiologisch ein entzündlicher Prozess zugrunde gelegt [49,50,51]. Dabei spielen ursächlich Verletzungen der Gefäßendothels eben so eine Rolle wie die Einlagerung oxidiertes LDL-Partikel und einer konsekutiven inflammatorischen Reaktion mit Einwanderung von mononukleären Zellen in das betroffene Gefäßareal. Die damit verbundene Zytokinfreisetzung führt durch Einwanderung von Fibroblasten, Synthese von extrazellulärer Matrix, Proliferation von glatten Muskelzellen und folglich einem bindegewebigen Umbau zur Entstehung einer fibrösen Plaque, woraus schließlich eine Lumeneinengung des betroffenen

Gefäßes resultiert [49]. Als messbarer Laborparameter für die Prognose arteriosklerotischer Prozesse in Gefäßen wird neben hohen LDL-Werten [5] seit einiger Zeit zunehmend der Entzündungsmarker CRP (C-reaktives Protein) in einen kausalen Zusammenhang gebracht [21,44,45,9].

Trotz langjähriger Forschung konnte die pathogenetische Entstehung der Arteriosklerose bis dato nur in Teilaspekten geklärt werden. Die Arterioskleroseforscher E.P. und J.M. Benditt, sowie G.M. Martin und C.A. Sprague gingen im Jahre 1973 davon aus, dass die atherogenen Prozesse der Gefäßwand von einer monoklonalen Proliferation glatter Muskelzellen ausgeht [34,1].

In der „Response to injury“-Hypothese von R. Ross und J. A. Glomset aus dem Jahre 1976 werden Verletzungen des Endothels für die Entstehung der Arteriosklerose verantwortlich gemacht [48]. Aufbauend auf dieser Hypothese wird inzwischen eine umfangreichere Reaktion der Gefäßwand auf chronische Reize als Ursache der Arteriosklerose postuliert, in welche neben den intimalen Endothelzellen auch das subendotheliale Gewebe mit Bindegewebszellen und glatten Myozyten miteinbezogen ist [49,52]. Neben den klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren führen mechanische, immunologische, virale oder bakterielle Stimuli zu einer Dysfunktion des Gefäßendothels mit pathogenetisch bedeutsamen Folgen: gesteigerte Permeabilität, besonders für Lipoproteine wie LDL, Hyperadhäsivität für Leukozyten und Thrombozyten, gesteigerte Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen und die gestörte Synthese und Sekretion von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen.

1.1.1 Proatherogene Effekte der Lipoproteine LDL und ox-LDL

Es herrscht Konsens darüber, dass eine Ablagerung von LDL (low density Lipoprotein) in der Gefäßintima als ein Ausgangspunkt für atherogene Prozesse betrachtet werden kann [37,17,18,55,56,6]. Der Akkumulation von LDL im subendothelialen Raum folgt eine Einwanderung von monozytären Entzündungszellen in das betroffene Gebiet mit Phagozytose der lipidreichen Partikel, Umwandlung in Schaumzellen und Initiation einer chronischen

Entzündungsreaktion. Dabei spielt die Freisetzung von Mediatoren und Zytokinen in Verbindung mit einer zellulären Immunreaktion eine Rolle [53,60]. Diese Prozesse können durch eine lokale Infektion verstärkt werden [39]. Die Einwanderung und Proliferation von Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Monozyten führt zusammen mit einer beträchtlichen Produktion von extrazellulärer Matrix zur erheblichen Verdickung der Arterienwand und somit zur Einengung des Gefäßlumens.

Untersuchungen zeigten, dass die insbesondere durch Oxidation chemisch modifizierten LDL-Moleküle eine inflammatorische Reaktion auslösen können. Für die in vivo Oxidierung der Lipoproteine werden Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Makrophagen und neutrophile Granulozyten verantwortlich gemacht [2].

So induziert oxidiertes LDL (ox-LDL) die Expression von Adhäsionsmolekülen für Monozyten und Makrophagen in Endothelzellen und glatten Muskelzellen der Intima und begünstigt hierdurch die transendotheliale Migration dieser Entzündungszellen [3,8,27]. Für die Endozytose von ox-LDL-Partikeln in Zellen monozytären Ursprungs wurde CD 36 (Cluster of Differentiation) als sog. Scavenger Rezeptor identifiziert [10]. Scavenger-Rezeptoren wurden erstmals von Goldstein und Brown als Rezeptoren modifizierter Lipoproteine beschrieben, die zu einer schnellen und unkontrollierten Aufnahme des modifizierten LDLs in Makrophagen und somit zu einer starken Anhäufung von Cholesterin in diesen Zellen führten [16]. Neben der Bildung dieser Schaumzellen wirkt oxidiertes LDL durch Aktivierung von Makrophagen und Freisetzung von Entzündungsmediatoren (IL-1 und TNF α), durch Hemmung der Vasomotorik und durch direkt zytotoxische Effekte proatherogen auf die Gefäßwand [7,24].

1.2 C-reaktives Protein

CRP wurde 1930 erstmals von Tillet und Francis [61] beschrieben und verdankt seinen Namen der Fähigkeit, mit dem C-Polysaccharid von *Streptococcus pneumoniae* zu interagieren. CRP besteht aus fünf identischen Polypeptideinheiten mit einem Molekulargewicht von je 21 kDa, die zu einem

planaren, pentagonalen Ring zusammengelagert sind und wird daher als Pentraxin bezeichnet. Als klassisches Akute-Phase-Protein stellt es einen hochsensitiven Inflammationsmarker dar, dessen Serumkonzentration in Folge einer akuten Verletzung, einer Infektion, eines Tumors oder anderer entzündlicher Stimuli um das circa 1000fache ansteigen kann [13]. Seine Plasmahalbwertszeit beträgt etwa 19 Stunden, der klinische Nachweis im Plasma oder Serum erfolgt mittels hochsensitiver Anti-CRP Antikörperverfahren.

1.2.1 C-reaktives Protein und Arteriosklerose

Patienten mit Folgeerkrankungen der Arteriosklerose wie instabiler Angina Pectoris und Myokardinfarkt weisen erhöhte Serumwerte für CRP auf [21,44,45,9,30,22,43]. So tritt CRP beispielsweise in koronaren Primärstenosen zusammen mit Makrophagen und Schaumzellen bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom auf [66].

Seit dem definitiven Nachweis von CRP in arteriosklerotischen Läsionen, wird vermutet, dass CRP nicht nur einen Indikator des ablaufenden Entzündungsprozesses in atheromatösen Plaques darstellt, sondern diesen begünstigt und zudem ursächlich für Vorgänge der frühen Atherogenese mitverantwortlich gemacht werden kann. Um die Rolle des CRP in der Atherogenese zu verstehen muss seine physiologische Funktionsweise betrachtet werden. CRP besitzt Eigenschaften eines Immunmodulators und bindet an verschiedene Liganden und biologische Partikel und vermittelt auf diese Weise deren Opsonierung oder induziert Signaltransduktionsprozesse.

Im Hinblick auf ursächliche Prozesse der Arteriosklerose bindet CRP an Apolipoprotein-B-haltige Liganden wie LDL und modifiziertes LDL in Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen [42,4] und fördert die Aufnahme dieser Lipidpartikel in Makrophagen [12]. Als hauptsächliche Bindungsstelle für CRP wird der niedrigaffine IgG-Rezeptor FcγRIIa an der Membranoberfläche von Monozyten und Makrophagen identifiziert, nach CRP-Bindung werden diese Zellen aktiviert und zur Phagozytose sowie zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren angeregt [5]. Ferner besitzt CRP chemotaktische Eigenschaften für monozytäre

Zellen und fördert die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin in Endothelzellen [41]. Aus diesen Gründen ist dem CRP eine wichtige Rolle in der frühen Phase der Atherogenese, insbesondere in der Entstehung von Schaumzellen zuzuschreiben.

CRP vermag das Komplementsystem, einen Teil der humoralen Immunabwehr, auf klassischem Weg zu aktivieren [70,72]. In der Atherogenese wird dem Komplementsystem eine wichtige Rolle zugeschrieben [63]. Komponenten der Komplementkaskade wurden sowohl in Tierversuchen [58], als auch in menschlichen [20,69] arteriosklerotischen Läsionen aufgefunden. Ein immunhistochemischer Nachweis des terminalen Membran-Angriffskomplexes (MAK) C5b-9 gelang vor einiger Zeit in Plaques aus humanen Koronararterien im Anfangsstadium der Arteriosklerose, was vermuten lässt, dass das Komplementsystem eine wichtige Rolle in der frühen Atherogenese spielt [67]. In sublytischen Konzentrationen führt der C5b-9 Komplex zu der Freisetzung von monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), das eine weitere Migration von monozytären Entzündungszellen in die Arterienwand induziert [64]. Zusätzlich regt C5b-9 die Proliferation von glatten Muskelzellen an [38]. Die Kollokalisierung von Komplement und CRP in tiefen Schichten der Intima kann als CRP-induzierte Komplementaktivierung in der Atherogenese interpretiert werden [65].

1.2.2 Synthese des C-reaktiven Proteins

CRP wird primär in der Leber synthetisiert. Daten aus jüngeren Untersuchungen zeigten, dass CRP gehäuft in arteriosklerotischen Läsionen zu finden ist, was eine lokale Synthese vermuten lässt [73]. Auf Grund der eingeschränkten Verfügbarkeit von PHHs (primären humanen Hepatozyten) sowie technischen Schwierigkeiten und ethischen Problemen wurden die molekularen Mechanismen der CRP-Synthese bisher nur teilweise entschlüsselt [19]. Untersuchungen an Hepatomzelllinien zeigten, dass die CRP-Synthese von Cytokinen, insbesondere von Interleukin 1 β und Interleukin 6 stimuliert wird [62,31,59,29,74,25]. An der IL-6 vermittelten CRP-Synthese sind die Transkriptionsfaktoren STAT 3 (signal transducer and inductor 3) und Mitglieder der C/EBP (CCAAT-Box/Enhancer-Binding-Protein) Familie, im speziellen C/EBP α , β und δ beteiligt, die an die

Promotorregion des CRP-Gens binden und dadurch den Transkriptionsprozess modifizieren. Des Weiteren sind die Untereinheiten p50 und p65 des Nukleären Faktors κB (NF- κB) in den Signaltransduktionsweg der Cytokin-vermittelten CRP-Synthese involviert [23]. Als ein alternativer Weg zur Modifikation der CRP-Synthese wird der über IL-8, Thrombin und Angiotensin II vermittelte PKC-pathway diskutiert [40,68,46]. Rezeptoren für diese Botenstoffe werden parallel zu ansteigenden CRP-Plasmawerten im Zusammenhang mit Entzündungsreaktionen vermehrt auf der Zelloberfläche humaner Hepatozyten exprimiert, [68,46] wobei insbesondere IL-8 eng mit arteriosklerotischen Prozessen vergesellschaftet zu sein scheint [12].

1.2.3 Proteinkinase C

Die Proteinkinase C (PKC), ein ubiquitäres, phospholipid-abhängiges Enzym ist in viele Signaltransduktionsprozesse zellulärer Mechanismen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose involviert. Durch die Übertragung von Phosphatresten auf Serin oder Threoninresten steuert die Proteinkinase C die Aktivität nachgeschalteter Enzymsysteme in physiologischen Systemen.

PKC Isoenzyme regulieren in vivo wichtige Schritte im Zellzyklus sowie der Proteinbiosynthese von Enzymen und Botenstoffen.

Bis heute wurden 11 verschiedene Isoformen beschrieben, die sich in ihrer Struktur und biochemischen Eigenschaften, ihrer Gewebsverteilung und zellulärer Lokalisation sowie ihrer Substratspezifität unterscheiden und in drei Untergruppen eingeteilt werden [47]:

Die konventionellen Subtypen (α , β_1 , β_{II} , γ) werden in Abhängigkeit von Ca^{2+} -Ionen, Diacylglycerol (DAG) und Phosphatidylserin aktiviert. Die Isoformen β_1 und β_{II} stellen alternative Spleißvarianten dar.

Die neuen (δ , ϵ , η , θ) und atypischen (ζ , λ , ι) Isoformen sind calciumunabhängig aktiv. Diacylglycerol (DAG) und Phosphatidylserin regulieren die Aktivität der neuen Isoformen, während die atypischen Formen der PKC phospholipidabhängig

aktivierbar sind. Die anfangs den neuen PKC-Isoformen zugeschriebene PKC μ wird seit neuerem aufgrund von Strukturabweichungen als PKD bezeichnet [58].

Strukturell werden die PKC-Isoformen in vier Untereinheiten gegliedert (C1-C4). Die Segmente C1-3 bilden die regulatorische, C4 die katalytische Domäne des Enzyms, beide Domänen sind über eine Hinge-Region gekoppelt.

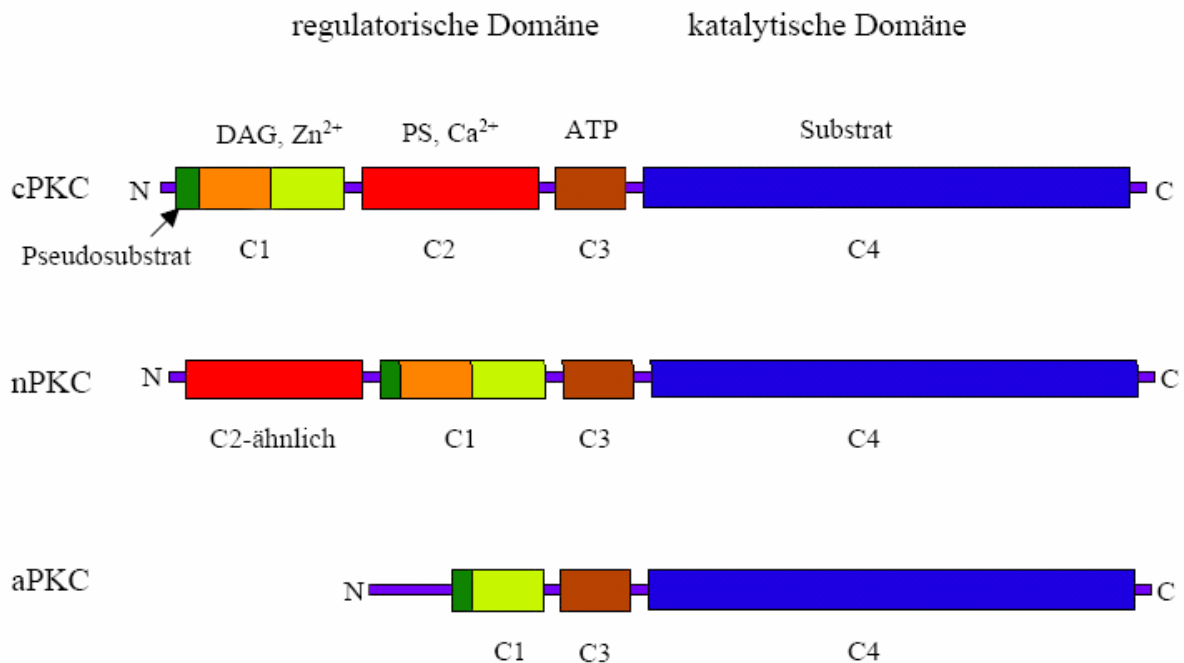


Abb. 1: Struktur der Proteinkinase C (PKC) Isoformen [47]: Die Bindungsstelle für Adenosin triphosphat (ATP) der regulatorischen Domäne (C3) und die katalytische Domäne (C4) sind bei allen Isoformen homolog. Die konventionellen PKC-Isoformen (cPKC) verfügen am N-Terminus (Segment C1) über eine Pseudosubstratbindungsstelle, ein Bereich zur Bindung von Diacylglycerin (DAG) und Zink-Ionen (Zn²⁺) sowie über eine Bindungsstelle für Calciumionen (Ca²⁺) Phosphatidylserin (PS) im Segment C2. Den neuen (nPKC) und den atypischen (aPKC) Isoformen fehlt der calciumbindende Anteil der regulatorischen Domäne.

Im inaktiven Zustand legt sich der N-Terminus als Pseudosubstrat in das aktive Zentrum der katalytischen Domäne. Die Aktivierung der konventionellen Isoform setzt die Bindung von DAG oder Phorbolestern wie z. B. PDBu an die Zinkfingerdomänen des Segmentes C1 voraus. Zudem binden Ca²⁺-Ionen und Phosphatidylserin an das aspartathaltige Segment C2 und ermöglichen nach Anlagerung von ATP an Segment C3 und des Substrates an C4 dessen Umsatz. Am aminoterminalen Ende der neuen Isoformen befindet sich ein C2-ähnliches Segment, das auf Grund des Fehlens von Aspartatresten keine Ca²⁺-Ionen binden kann. Atypische Isoformen besitzen weder das C2-Segment, noch die Bindungsstelle für DAG in Segment C1.

Exemplarisch für konventionelle Isoformen soll der Aktivierungsprozess von PKC β_{II} nach Bindung der Liganden dargestellt werden:

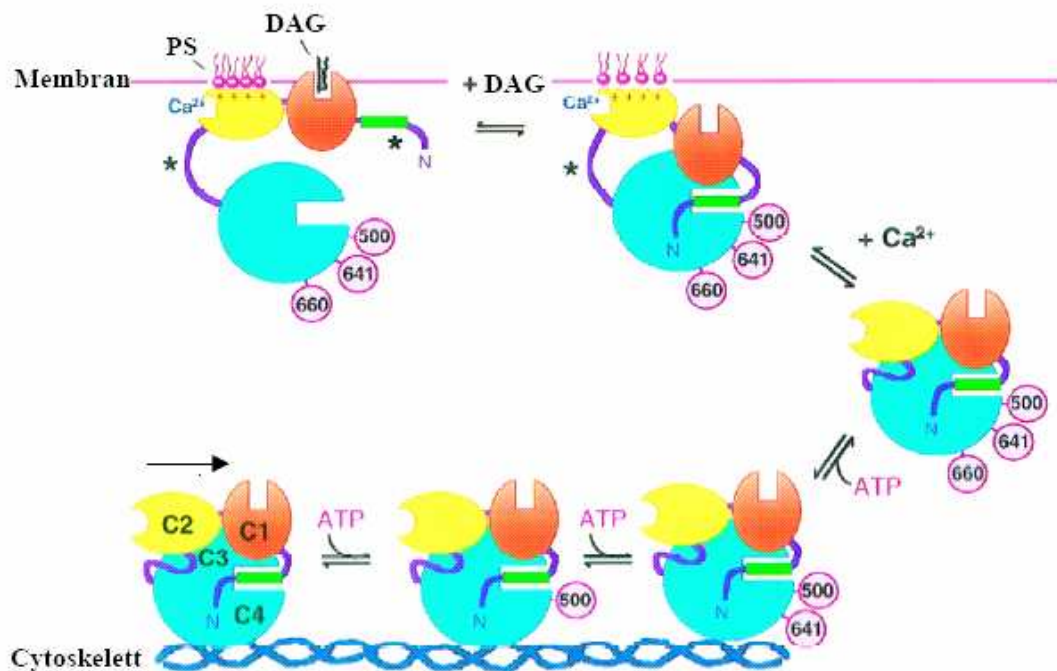


Abb. 2: Aktivierung einer konventionellen Proteinkinase C (PKC) am Beispiel der PKC β_{II} [47]. Die im Cytoskelett verankerte PKC wird nach Phosphorylierung an drei Aminosäuren ins Zytosol freigegeben. Die Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen begünstigt die Anlagerung an die Zellmembran. Diacylglycerin (DAG) und Phosphatidylserin (PS) dienen als hydrophobe Anker während nach Öffnung des aktiven Zentrums durch die N-terminale Pseudosubstratstruktur das Substrat binden und umgesetzt werden kann. ATP: Adenosintriphosphat

In inaktivem Zustand liegt die PKC fest im Cytoskelett gebunden vor. Nach Phosphorylierung an einem Threoninrest durch eine PKC-Kinase kommt es zu zwei Autophosphorylierungen von Aminosäureresten am C-terminalen Ende des Enzyms, die PKC wird dadurch in das Zytosol abgegeben. Nach Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem endoplasmatischen Reticulum, das sich an Aspartatreste der C2-Domäne anlagert, findet eine Konformationsänderung und Bindung der PKC an die Phospholipide der Zellmembran statt. DAG und Phosphatidylserin dienen zur Verankerung der PKC in der Zellmembran, während das Pseudosubstrat aus der Bindungstasche freigesetzt und dadurch das Enzym in seinen aktiven Zustand übergeführt wird. Die in Abb. 2 mit Stern gekennzeichneten Scharnierregionen sind in der aktiven Konformation besonders empfindlich für einen proteolytischen Abbau.

Im Jahr 2004 publizierten Ivashchenko et al. eine Arbeit, die erstmals eine Beteiligung des PKC-pathway in der Biosynthese des C-reaktiven Proteins in Leberzellen darlegte [23]. Untersuchungen an primären humanen Hepatozyten (PHH) und an transfizierten HepG2-Zellen führten zu folgenden, für diese Arbeit wegweisenden Ergebnissen im Hinblick auf die PKC-abhängige CRP-Synthese:

In PHHs werden sowohl die Transkription als auch die Synthese von CRP von 4 α -Phorbol 12,13-Dibutyrat (PDBu) stimuliert. PDBu aktiviert den konventionellen PKC-pathway und führt über die Phosphorylierung von Serin 105 zur Steigerung der transkriptionellen Aktivität von C/EBP β und steigert dadurch die CRP-Syntheserate in PHHs. Eine signifikante Konzentrationserhöhung von CRP nach Stimulation mit PDBu in Zellüberständen konnte mittels ELISA in Zellüberständen nachgewiesen werden.

PDBu stimuliert die CRP-Promotoraktivität in ABEK-14 Zellen. Für das CRP-Luciferase-Promotorkonstrukt in ABEK-14 Zellen konnte neben der Stimulierbarkeit durch IL1, IL6 und deren synergistischem Effekt ebenso eine signifikante Steigerung der Promotoraktivität nach PDBu-Stimulation erreicht werden. Kombinierte Stimulation mit IL1, IL6 und PDBu bewirkt eine Superinduktion des CRP-Promotors in ABEK-14 Zellen.

PDBu aktiviert die Isoform PKC β_{II} in ABEK-14 Zellen. 60 Minuten nach Stimulation mit PDBu konnte eine Translokation von PKC β_{II} an die Kernmembran aufgezeigt werden.

IL-8 regt PHHs PKC-abhängig zur Freisetzung von CRP an. Auf der Suche nach einem endogenen PKC-Aktivator wurden PHHs mit IL-8 stimuliert. In Zellüberständen konnte eine signifikante Erhöhung der CRP Konzentration gemessen werden. Kombinierte Behandlung der Zellen mit IL-8 und dem Bisindolylmaleimid Derivat LY333531, einem kompetitiven Antagonisten von PDBu, bewirkte eine signifikante Erniedrigung der CRP-Freisetzung. Damit erhärtet sich die These, dass die CRP-Synthese in vivo durch IL-8, vermittelt über den PKC-pathway angetrieben wird.

1.3 Strategien zur Blockade des atherogenen Effektes von CRP

Zur Verminderung der atherogenen Auswirkungen des CRP sind mehrere Ansätze denkbar:

1. Blockade der CRP-induzierten Komplementaktivierung
2. Antagonismus am CRP-Rezeptor
3. Inhibition der CRP-Synthese, diesem Punkt soll in dieser Arbeit besondere Aufmerksamkeit zukommen, dabei soll zum einen die Antagonisierbarkeit von IL-8 und zum anderen die Blockade der Proteinbiosynthese von CRP diskutiert werden.

Blockade der CRP-Biosynthese mittels siRNA

Strategien zur Inhibierung der Expression von krankheitsassoziierten, onkogenen und viralen mRNA stellen eine Grundlage für die Entwicklung neuer Therapeutika dar und dienen als wertvolle Werkzeuge zum Studium von Genfunktionen in Zellen. Dazu können Antisenseoligodesoxynukleotide, Ribozyme, Aptamere und in jüngster Zeit siRNA (*small interfering RNA*) verwendet werden, mit denen es möglich ist, spezifisch die Expression einzelner Gene auszuschalten bzw. zu modulieren.

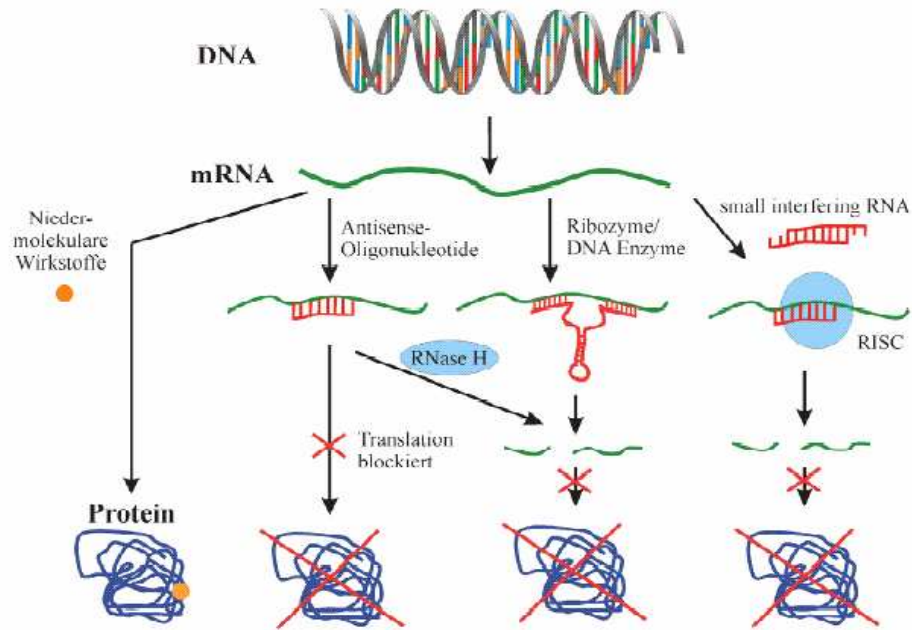


Abb. 3: Wirkungsweise von Antisense-Molekülen: Während konventionelle Therapeutika die Funktionsweise bestimmter Proteine inhibieren (links), verhindern Antisense-Oligonukleotide, Ribozyme und siRNA bereits deren Expression durch sequenzspezifische Interaktion mit zellulärer messenger RNA. Modifiziert nach [28]. DNA: Desoxyribonukleinsäure, mRNA: messenger-Ribonukleinsäure, RNase H: RNA-spaltendes Enzym H, RISC: RNA induced silencing complex, siRNA: small interfering Ribonukleinsäure

Die siRNA vermag an die mRNA zu binden und ist als doppelsträngiges RNA Molekül (dsRNA) befähigt, überaus wirksam und spezifisch Genprodukte auf posttranskriptioneller Ebene zu unterdrücken (Gen-silencing). Dieses Phänomen, das auch als RNA Interferenz (*RNA interference* oder RNAi) bezeichnet wird, wurde 1998 erstmalig von Fire et al. im Fadenwurm *C. elegans* aufgezeigt und konnte bereits in zahlreichen Organismen wie Pflanzen, Protozoen, Nematoden und Insekten sowie in vitro nachgewiesen werden.

Die Funktionsweise der RNA-Interferenz lässt sich wie folgt darstellen [35]:

Einschleusen von doppelsträngiger RNA in die Zielzelle führt zu deren Fragmentierung in 19-mere Nukleotidduplexe durch das Protein *Dicer*, eine Endonuklease des RNase III-Typs. Diese werden als *small interfering RNAs* (siRNAs) bezeichnet und enthalten an ihren 3'-Enden symmetrische Überhänge mit einer Länge von zwei Nukleotiden. Nach Entwindung der Duplex durch eine Helicase erfolgt der Einbau des relativ stabileren Strangs, der als Antisense-Strang bezeichnet wird, in den proteinhaltigen *RNA induced silencing complex*

(RISC). Der aktivierte RISC induziert die mediane Spaltung der zum Antisense-Strang komplementären messenger-RNA, was zu deren Degradation durch zytosolische Nukleasen führt.

Für in vitro Versuche werden synthetische siRNA-Fragmente kurzer Länge verwendet, da ein Einschleusen langer dsRNA die unspezifische Inhibition der Translation sowie einen RNA-Abbau auslösen würde [15].

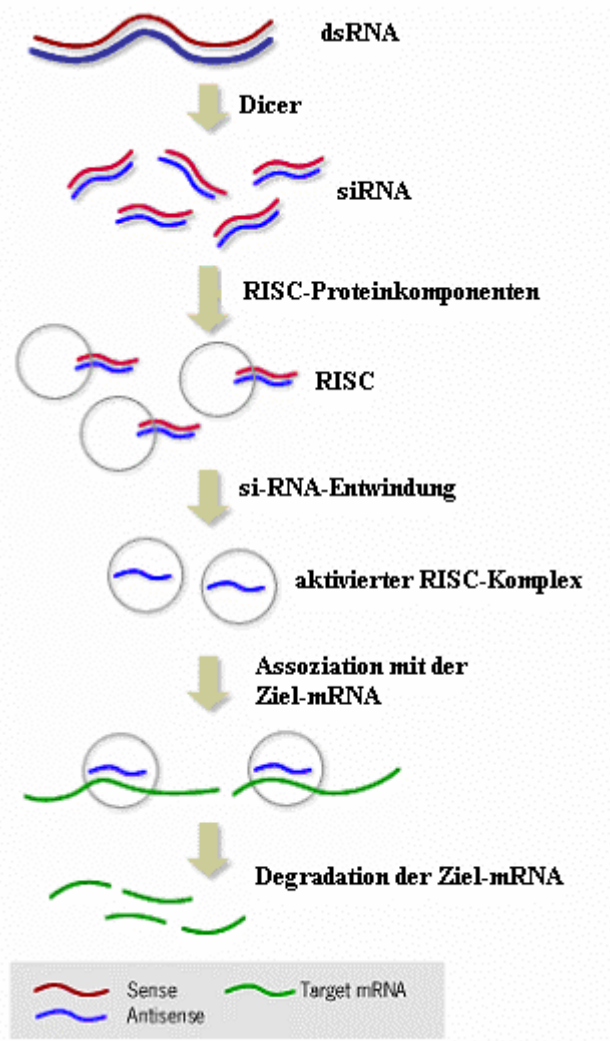


Abb. 4: Funktionsweise der RNA-Interferenz. Der intrazellulären Einschleusung und Fragmentierung doppelsträngiger RNA folgt die Bildung des RISC-Komplexes. Dieser Protein-Nukleinsäurekomplex bindet in seiner aktivierten Form die Ziel-mRNA und führt schließlich zu deren Degradation durch zytosolische Nukleasen. RNA: Ribonukleinsäure, dsRNA: Doppelstrang-RNA, mRNA: messenger-RNA, siRNA: small interfering RNA, RISC: RNA induced silencing complex, Dicer: eine Endonuklease

Fragestellung:

1. Welche Isoformen der Proteinkinase C können in primären humanen Leberzellen in vitro nachgewiesen werden?
2. Lässt sich die CRP-Synthese in primären humanen Leberzellen neben der bekannten Stimulierbarkeit mit IL-1, IL-6 auch über den IL-8 - vermittelten PKC-pathway stimulieren?
3. Ist ein erfolgreiches Gen-silencing im Hinblick auf die CRP-Promotoraktivität im ABEK-14 Zellmodell mit Hilfe der siRNA-Methode möglich?

2 Material und Methoden

2.1 Material

Material:

Hersteller:

Pipetten und Gefäße

Pipetten 2, 20, 100, 200, 1000 µl	Gilson
Pipettenspitzen	Gilson
Multipette	Gilson
Multipettenspitzen 5, 20 ml	Gilson
elektrische Pipette	Hirschmann Laborgeräte
Pipetusspitzen 10, 25, 50, 100 ml	Hirschmann Laborgeräte
Falcon 25, 50 ml	Falcon
Flaschen 100, 500, 1000 ml	Schott
Tube 1.5, 2 ml	Eppendorf

Zellkultur:

Spezielle Geräte:

Zählkammer	Neubauer
Lichtmikroskop	Leica

Kulturschalen:

T75-Platte	Falcon
6-Well-Platte	Falcon
24-Well-Platte	Falcon

Lösungen/Medium:

Kollagenlösung: (Kollagen in 0,02 N Essigsäure, Verdünnungsfaktor 1:94)	Merck
Trypanblaulösung	Linaris Biologische Produkte
Trypsin/EDTA	Linaris Biologische Produkte
dd H ₂ O	Universität Ulm
Hepatozytenmedium	GIBCO
HepG2-Medium (98% IMDM, 10% FCS, 1% PSG, 1% Glutamin)	GIBCO
PBS	Linaris Biologische Produkte

Zellen:

primäre humane Hepatozyten: Lot-Nr: 3F1252 (7j.Spender)	Cambrex
CR13704H1H	Dominion Pharmakine

3F1207	Cambrex
CR04304H1H (53j. Spender) CR13704H1H (74j. Spender)	Dominion Pharmakine Dominion Pharmakine
HepG2-ABEK14-Zellen	DSMZ
Stimulanzen:	
rekombinantes humanes Interleukin 1	Invitrogen
rekombinantes humanes Interleukin 6	Invitrogen
rekombinantes humanes Interleukin 8	Invitrogen
PDBu (4 α -Phorbol 12,13-Dibutyrate)	Invitrogen
Transfektionsmaterialien:	
Transfektions-Kit	Invitrogen
siRNA:	
ICAM	Invitrogen
negativ	Invitrogen
PKC α	Invitrogen
PKC β_1	Invitrogen
Lysispuffer für Western-Blot:	
NET-Buffer	Serva
CHAPS	Sigma
Iodoacetamid	Sigma
PMSF	Serva
NP-40	Serva
Protease-Inhibitor	Boehringer
dd H ₂ O	
Proteinassay:	
ELISA-Reader	Lambda
CRP-ELISA-Kit	American Diagnostics
Western-Blot:	
Geräte:	
Western-Blot Kammer	Biometra
Blotgerät	Biometra
Stromgerät	Biometra
pH-Meter	WTW Multical

Materialien, Reagenzien:

12% Tris-Glycin-Gel	Invitrogen
20% Tris-Glycin-Gel	Invitrogen
Filterfilz	Invitrogen
Nitrozellulosemembran	Amersham Biosciences
Film	General Electrics Healthcare
Filmkassette	Amersham Biosciences
Applikationsspritze	Hamilton
Laufpuffer 10-fach	Sigma
Probenlaufpuffer	Sigma
Mercaptoethanol	Sigma
Transferpuffer (20 ml Ethanol, 0,6 g TRIS-Base, 2,2 g Glycin, ad 200 ml dd H ₂ O)	Sigma
Waschpuffer (100 ml 10x PBS, 10 ml 10% Tween 20, ad 1000 ml dd H ₂ O)	Sigma
Blockpuffer (5 g Magermilchpulver, 1 ml 10% Tween 20, ad 100 ml PBS 1x)	Sigma
ECL-Reagenz	Pierce
Stripping-Reagenz	Pierce

Antikörper:

PKC α	Santa Cruz Biotechnology
PKC β _I	Santa Cruz Biotechnology
PKC β _{II}	Santa Cruz Biotechnology
PKC γ	Santa Cruz Biotechnology
PKC δ	Santa Cruz Biotechnology
PKC ϵ	Santa Cruz Biotechnology
ICAM	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Rabbit	Dako Cytomation
Anti-Maus	Dako Cytomation
Anti-Schwein	Dako Cytomation
Alpha-Tubulin	Dako Cytomation

ELISA:

96 Well Platte	Greiner Bio-one
ELISA-Kit	Imunoclone, American Diagnostics
ELISA-Reader	

Luciferase Assay:

Luciferase Assay-Kit	Promega
Luminometer-Tube	Greiner Bio-one
Luminometer	Lambda

2.2 Methoden

2.2.1 Methoden zur Zellkultivierung

2.2.1.1 Kultivierung primärer humaner Hepatozyten

Vor der Kultivierung wurden die vorgesehenen 6-Well-Zellkulturschalen mit einer Kollagenlösung (Kollagen in 0,02 N Essigsäure, 60 µg/cm²) behandelt und der Überstand nach 60 min bei Raumtemperatur entfernt. Vor dem Einbringen der Zellsuspension wurde die Kulturschale zweimal mit PBS-Lösung gewaschen. Cryokonservierte, kommerziell erhältliche primäre humane Hepatozyten (Dominion Pharmakine; Cambrex) stammen aus Spenderlebern und werden in Flüssig-Stickstoff (-183°C) gelagert. Zum Auftauen wurden die Cryoröhrchen kurz im 37°C-Wasserbad geschwenkt, die Zellsuspension mit 20 ml kaltem Zellkulturmedium vermischt und die Zellen anschließend in der Zellzentrifuge bei 50 g und 4°C für 3 min pelletiert. Nach Abnahme des Überstandes erfolgte die Resuspension des Zellpellets in 10ml Medium und die anschließende Bestimmung der Zellviabilität mit Hilfe der Trypanblaumethode sowie das Auszählen der viablen Zellen unter der Neubauer-Zählkammer. Hierfür wurden 20 µl der Zellsuspension mit der gleichen Menge einer 0,5-prozentigen Trypanblaulösung (Merck, Darmstadt) vermischt. Tote Zellen erscheinen durch den in das Zytosol eindringenden Farbstoff blau und können so von lebenden, transparenten Zellen unterschieden werden.

Die isolierten Hepatozyten wurden auf die Kollagen beschichteten 6-Well-Zellkulturschalen mit einer Zelldichte von 300.000 Zellen pro cm² aufgetragen. Die Zellen wurden bei 37°C unter 95% Luft und 5% CO₂ inkubiert, bis sie an der Kollagenschicht adherierten. Das Medium wurde alle 2 Tage gewechselt.

2.2.1.2 Kultivierung von ABEK14-Zellen

Ausgangszelle für das ABEK14-Zellmodell ist die kommerziell erhältliche HepG2-Zelllinie. HepG2-Zellen sind menschliche Hepatomzellen und stammen ursprünglich aus dem Tumorgewebe eines 15-jährigen argentinischen Jungen mit Hepatozellulärem Karzinom (1975). Diese Lebertumorzellen, erhältlich aus der deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, sind einfacher zu kultivieren als primäre humane Leberzellen. Diese eignen sich aufgrund ihrer Fähigkeit zur Synthese zahlreicher Proteine als Ausgangszellen für das biologische Zellmodell der hier durchgeführten Versuche.

Als ABEK14-Zellen werden speziell mit einem CRP-Promotor/Luciferase-Konstrukt stabil transfizierte HepG2-Zellen bezeichnet. Die ABEK14-Zelllinie wurde für die hier durchgeführten Versuchsreihen bereitgestellt.

Zu deren Herstellung wurde zunächst ein Fragment des humanen CRP-Promotors (–1005 to +12 bp) aus der menschlichen DNA kloniert.

Forward primer: 5'-ATGGTACCGTAAGATTGACAGACAGTGTGGAG-3';

reverse primer: 5'-ATCTCGAGGGCTAGAAGTCCTAGATCTCTTGC-3'.

Das Polymerase-Ketten-reaktions- (PCR) Produkt wurde mit der Restriktionsendonuklease Kpn-*Xho*I geschnitten, in den pGL3-BasicVector (Promega) kloniert und sequenziert. Die Zellen wurden mit dem p1000/CRP/Luciferase-Konstrukt und pcDNA 3.1 mittels Lipofectamine 2000 (LF2000; Invitrogen) kotransfiziert. Nach Zugabe von Standardmedium, dem 1 mg/mL G418 (Invitrogen) zugefügt wurde konnten nach 18 Tagen die Zellklone isoliert werden. Einer dieser Klone (HepG2–ABEK-14) mit IL-6-induzierbarer p1000/CRP/Luciferase-Aktivität wurde für die weiteren Experimente verwendet.

Die ABEK14-Zellen wuchsen als Monolayerkultur mit einer Verdopplungszeit von 50-60 Stunden in T-75-Platten bei 37°C unter 95% Luft und 5% CO₂. Zur Konstanthaltung der Zelldichte erfolgte eine Passagierung der Zellen nach 5 Tagen. Das Medium wurde alle 2 Tage gewechselt.

2.2.1.2.1 Vorgehensweise beim Splitten von ABEK14-Zellen

Zunächst erfolgte die Beschichtung der vorgesehenen Kulturgefäße mit Kollagen wie oben beschrieben ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Für die Kultur der ABEK14-Zelllinie wurden 24-Well-Platten für Versuche und T-75-Platten verwendet.

Zum Ansatz des Nährmediums wurden 500 ml IMDM, 10% FCS, 1% PSG (GIBCO) sowie 1% Glutamin zugesetzt und anschließend im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Gleichzeitig wurde eine Trypsinlösung (Lagerung bei 4°C) auf Raumtemperatur gebracht. Die in der T-75-Platte befindlichen ABEK14-Zellen wurden mittels Absaugpumpe vom Medium befreit und anschließend mit 5 ml PBS gewaschen. Zum enzymatischen Ablösen wurden die Zellen mit 4 ml Trypsin versetzt, 5 min bei 37°C inkubiert und anschließend in 5 ml Medium aufgenommen. Die Pelletierung erfolgte 5 min bei 1250 U/min. Das Pellet wurde in 1 ml Medium resuspendiert und die Zellsuspension auf 10 ml mit Medium aufgefüllt. Die Zellzählung wurde ohne Viabilitätsbestimmung mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend mit der Zelldichte von 90.000 Zellen pro well in die kollagenbeschichtete 24-well-Platte ausgesät und bei 37°C unter 95% Luft und 5% CO_2 kultiviert. Das Medium wurde alle 2 Tage gewechselt.

2.2.2 Transfektion von siRNA in ABEK14-Zellen

Die Transfektion stellt ein nonvirales Verfahren zur Einschleusung von Nukleotiden, wie DNA, RNA oder siRNA, in eukaryote Zellen dar. Mittels des verwendeten Transfektionsreagenz *OligofectamineTM* (Invitrogen) wurde ein Einbringen von oligonukleotidischer siRNA (Invitrogen) in kultivierte ABEK-14 Zellen ermöglicht.

Um optimale Bedingungen für die Transfektion zu erreichen, wurden die ABEK14-Zellen in 24-well-Schalen mit einer Zelldichte von 90.000-100.000 Zellen/Well ausplattiert und nach 24 Stunden bei einer Zellkonfluenz von 70-80% dem Verfahren bei keimarmen Bedingungen unter der Laminar Air Flow Bench

unterzogen. Verwendet wurden spezielle, gestopfte zum Umgang mit RNA geeignete Pipettenspitzen.

Zunächst wurden 10ml FCS-freies Medium (Optimem) auf 37°C erwärmt und die Transfektionsreagenzien Oligofektamin und Optimem im Verhältnis 1:4 vermischt. Die verwendeten siRNAs wurden je nach Versuchsreihen in Konzentrationen von 50 nM -400 nM in je 40 µl Optimem verdünnt und für 5 min inkubiert. Nach der Zugabe von je 10 µl des vorbereiteten Transfektionsreagenz-Gemisches (Oligofektamin + Optimem) und anschließender Inkubation für 20 min wurden die Ansätze nach Vorlage von 200 µl FCS-freiem Medium/Well auf die 2x mit PBS gewaschenen Zellen gegeben. Die Zugabe von FCS-haltigem Standardmedium erfolgte nach 4 Stunden.

2.2.3 Stimulation von Leberzelllinien mit Zytokinen

2.2.3.1 Stimulation von primären humanen Hepatozyten

Um die Proteinbiosyntheserate des CRP in primären Leberzellen zu variieren, wurden die Zellen nach 24 Stunden Kultur mit humanem Interleukin 1 β , 6 und 8 sowie PDBu (4 α -Phorbol 12,13-Dibutyrate) stimuliert. Dazu wurden jeweils verschiedene Konzentrationen der Stimulanzen in je 4 ml Standardmedium pipettiert und auf je ein Well gegeben.

Tab. 1: Tabelle zur Interleukinkonzentration. Optimierte Konzentrationen zur Zellstimulation (rechte Spalte) der Zytokine (linke Spalte) und ihre Ausgangskonzentration vor Verdünnung. IL: Interleukin, PDBu: 4 α -Phorbol 12,13-Dibutyrat

Stimulanz	Ausgangskonzentration	Stimulationskonzentration
IL-1 β	2,5 µg/ml	10 ng/ml
IL-6	10 µg/ml	10 ng/ml
IL-8	10 µg/ml	10 ng/ml
PDBu	1 mM	100 nM

Vor dem Einbringen auf den Zellrasen wurde das Medium jeder 6-well Kulturplatte abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gespült.

Es wurden je ein Well mit IL-1 β , 6, 8 und PDBu stimuliert, ein weiteres Well (NT) blieb unbehandelt und wurde ausschließlich mit 4 ml Standardmedium versetzt.

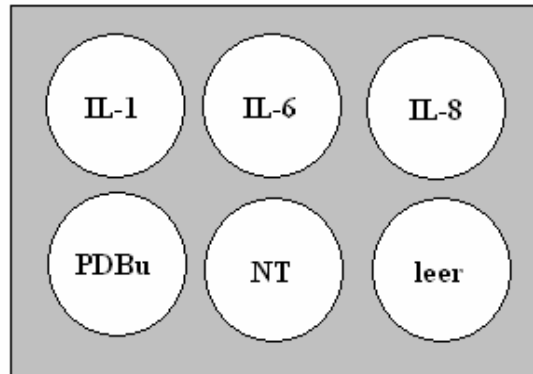


Abb. 5: Schema zur Stimulation primärer humaner Hepatozyten (6-Well Platte). IL: Interleukin, PDBu: 4 α -Phorbol 12,13-Dibutyrat, NT: non treated (unbehandelt)

Nach 24 Stunden Stimulationszeit wurden die Zellüberstände entnommen und der quantitativen CRP-Bestimmung mittels ELISA-Verfahren zugeführt.

2.2.3.2 Stimulation von ABEK14-Zellen

Die ABEK14-Zellen wurden untransfiziert, sowie 24 h nach erfolgter Transfektion, mit PDBu (100 nM) stimuliert. Hierzu wurden 1,5 μ l PDBu mit 15 ml Medium im *Falcon*TM vermischt und je 1 ml der Mischung auf je ein Well der zu stimulierenden Zellen auf der 24-Well-Platte gegeben. Nach 24 Stunden Stimulationszeit konnten die Zellen abgelöst und für Untersuchungen lysiert werden.

2.2.4 Lyse von Leberzellen

Die für Western-Blot-Analysen notwendigen Proteinvolllysate wurden mit großer Sorgfalt unter ständiger Kühlung auf Eis und, um hauteigene Proteasen fernzuhalten, mit Handschuhen hergestellt. Zunächst wurde der Lysispuffer aus folgenden Komponenten angesetzt:

Tab.2: Tabelle zum Ansatz des Lysispuffers für Proteinvolllysate. Es sind die verwendeten Reagenzien (linke Spalte) in ihrer eingesetzten Konzentration (rechte Spalte) dargestellt.

Reagenz	für 1 ml Lysepuffer
NET buffer pH 8,0	100 µl
CHAPS 600 nM	10 µl
Iodoacetamide 10 mM	10 µl
10 % NP-40	100 µl
PMSF 0,1 M	0,5 µl
Protease Inhibitor 50x	20 µl
dd H ₂ O	760 µl

Zur Vorbereitung wurden die Zellen von Medium befreit, 1x mit PBS gewaschen und anschließend die gewünschte Menge an Lysispuffer direkt auf die Zellen pipettiert. Je nach Well-Größe wurden folgende Mengen an Lysispuffer eingesetzt:

Tab. 3: Tabelle zur erforderlichen Menge an Lysispuffer für 6- und 24-Well Platten.

6-Well-Zellkulturplatte	200 µl Lysispuffer / Well
24-Well-Zellkulturplatte	80 µl Lysispuffer / Well

Die Inkubation der Zellen mit dem Lysispuffer erfolgte auf der Wippe bei 4°C für 20 min. Anschließend wurde der gelöste Zellrasen mit Hilfe einer Pipette resuspendiert, im Eppendorf-Gefäß aufgenommen und 20 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand entspricht dem Proteinvolllysat und kann nach sorgfältiger Entnahme bei -20°C mehrere Wochen gelagert werden.

2.2.5 Ermittlung des zellulären Eiweißgehaltes im Proteinassay

Die Proteinbestimmung wurde mit dem BCA-Test nach Pierce durchgeführt. Die zugrunde liegende Reaktion ist eine Biuret-Reaktion: Proteine bilden in alkalischem Milieu Komplexe mit Kupfer-II-Ionen. Nach Reduktion der Kupferionen bildet sich ein violetter Farbkomplex. Die Reaktionslösungen weisen je nach Proteingehalt unterschiedliche Absorptionsmaxima auf. Um nun den Proteingehalt einer Probe zu bestimmen, ist zunächst das Erstellen einer Standardkurve notwendig. Hierbei werden die jeweiligen Absorptionsmaxima für definierte Proteinkonzentrationen gemessen.

Zunächst wurden die lagerungsbedingt gefrorenen Proteinvolllysate sowie Proteinstandards mit den fixen Proteinkonzentrationen 10, 20, 30, 40, 50 und 60 µg/ml langsam auf Eis aufgetaut. Währenddessen wurden 1-5 ml des Analysereagenzes aus folgenden Komponenten zusammengesetzt:

Tab. 4: Ansatz des Detektionsreagenzes für den Proteinassay. Angabe der Mischungsverhältnisse der Komponenten A, B und C und der Volumina für 5 ml Gesamtansatz.

Reagenz	Mischungsverhältnis	Für 5 ml Ansatz
A	50%	2,5 ml
B	48%	2,4 ml
C	2%	0,1 ml

Nach folgendem Schema wurde eine 96-Well Platte mit Reagenzien versetzt:

$\mu\text{g/ml}$ Proteinstandard		Konzentrationsverhältnisse der zu untersuchenden Proteinlysate				
60			[1:50]	[1:50]	[1:100]	[1:100]
50						
40						
30						
20						
10						
0						

Abb. 6: Pipettierschema zur 96-Well Platte für Proteinassays. Die Proteinstandards in ihren Konzentrationen 0-60 $\mu\text{g/ml}$ (linke Spalten, hell) sowie die zu untersuchenden Proteinlysate in den jeweiligen Konzentrationen (rechts oben, dunkel) wurden jeweils doppelt aufgetragen.

Die im oben aufgeführten Schema hell unterlegten Wells waren für die Proteinstandards (10-60 $\mu\text{g/ml}$) bestimmt, der hier dunkel schraffierte Bereich diente dem Auftragen der zu analysierenden Proteinlysate in verschiedenen Konzentrationen (1:50-1:200). Die unterste Reihe (0) blieb frei von Protein. Zunächst wurden in die proteinfreien Wells sowie die Wells für die Proteinproben je 100 μl dd H_2O vorgelegt. Anschließend wurden je zweimal 100 μl der jeweiligen Proteinstandards in die vorgesehenen Wells sowie 1-2 μl der Proteinproben in die mit dd H_2O versetzten Vertiefungen pipettiert. Danach wurden alle gefüllten Wells mittels einer Multipette mit je 100 μl des Detektionsreagenz-Gemisches versetzt und die Platte bei 60°C für 1 h im Wärmeofen inkubiert. Die maschinelle Auswertung erfolgte schließlich photometrisch bei 562 nm am computergekoppelten ELISA-Reader.

2.2.6 Western-Blot

Für Western-Blot-Analysen wurde ein Protein-Volllysat zunächst elektrophoretisch in einem Tris-Glycin-Gel aufgetrennt und durch eine senkrecht zum Gel angelegte Spannung auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. An der Membran lassen sich nach Blockade unspezifischer freier Bindungsstellen bestimmte Eiweiße selektiv über Antikörperverfahren detektieren.

Zu Beginn erfolgte die Befüllung der mit 1-2 Gelen ausgestatteten Western-Blot-Kammer mit 400 ml Laufpuffer, der in zehnfacher Konzentration gelagert und daher vorher 1: 10 verdünnt werden muss. Des Weiteren wurde der bei -20°C gelagerte Probenlaufpuffer auf Raumtemperatur gebracht und unter dem Abzug mit der äquivalenten Menge Mercaptoethanol versetzt.

Vor der Beladung des Tris-Glycin-Gels mit bis zu 35 µl Proteinlysat wurden definierte Mengen dieser Eiweißproben (5-35 µl) mit je 1/5 des Probenlaufpuffergemisches versetzt und bei 95°C 10 min denaturiert. Mit der Hamilton-Spritze wurden nun unter großer Sorgfalt zunächst die vorderste Tasche mit dem käuflichen Proteinleiter und anschließend die weiteren Taschen des 4-12 (-20) prozentigen Tris-Glycin-Gels mit den zu analysierenden Proteinlysat-Puffermischungen befüllt. Zwischen jeder neuen Befüllung wurde die Hamilton-Spritze mit Wasser gespült. Unter einer Spannung von 110 mV wurden die Eiweißproben im Tris-Glycin-Gel für die Dauer von 2 h elektrophoretisch aufgetrennt. Für den anschließenden Transfer der Proteine (Blotting) wurde eine Nitrozellulosemembran sowie zwei Wattefilter zugeschnitten, in Transferpuffer (20 ml Ethanol, 0,6 g TRIS-Base, 2,2 g Glycin, ad 200 ml dd H₂O, pH 8,3) gelegt und anschließend ein Blot-Sandwich aus Filter, Nitrozellulosemembran, Tris-Glycin-Gel und wieder Filter in dieser Reihenfolge von unten nach oben auf dem Blotgerät aufgebaut. Ein Stromfluss von 150 - 160 mA sorgte innerhalb einer Stunde für die Übertragung der aufgetrennten Proteine vom Gel auf die Nitrozellulosemembran.

Nach anschließender einstündiger Inkubation in Blockpuffer (5 g Magermilchpulver, 1 ml 10% Tween 20, ad 100 ml PBS 1x) wurde der Erstantikörper (1-5 µl in 10 ml Blockpuffer verdünnt) möglichst spezifisch für ein zu detektierendes Protein hinzugefügt und über Nacht inkubiert.

Nach fünfmal 5 min Waschen mit Waschpuffer (100 ml 10x PBS, 10 ml 10% Tween 20, ad 1000 ml dd H₂O) wurde die Nitrozellulosemembran 1 h mit dem Zweitantikörper versetzt, welcher an das fc-Fragment des Erstantikörpers bindet und mit dem Enzym HRP (*Horse Radish Peroxidase*) zur Katalyse der nachfolgenden Chemolumineszenzreaktion gekoppelt ist. Nach einem weiteren Waschvorgang wurde die Membran für 1 min in ECL-Lösung (*Enhanced Chemiluminescence*) getaucht, deren Bestandteil vom Antikörper-gekoppelten Enzym als Substrat umgesetzt wird. Anschließend wurde ein Röntgenfilm über der in Klarsichtfolie verpackten Membran inkubiert, auf dem dann die entsprechenden Proteine anhand ihrer Position detektiert werden konnten. Variable Belichtungszeiten beeinflussten die Schwärzung des Films.

2.2.6.1 Strippen von Westernblot-Membranen zur α -Tubulin Ladekontrolle

Zum Nachweis mehrerer Proteine auf einer Membran kann das Antikörperkonjugat aus einem erfolgten Versuch entfernt und eine zweite Immunreaktion auf der Membranoberfläche induziert werden. Hierzu wurde die Membran zunächst 15 min in Stripping Reagenz (*Pierce*) inkubiert und so von gebundenen Antikörpern befreit. Nach 20 min Waschen mit Waschpuffer wurde erneut 1 h mit Blockpuffer geblockt und anschließend wie oben beschrieben α -Tubulin mit Erst- und Zweitantikörper nachgewiesen. Das Protein α -Tubulin ist ein ubiquitärer Bestandteil des Cytoskeletts in eukaryoten Zellen und eignet sich daher als Gel-Ladekontrolle.

2.2.7 ELISA

Der CRP-ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, *IMUNOCLONE*[®], *American Diagnostics Inc.*) ist ein hochsensibles immunologisches Nachweisverfahren zur Messung des Gehaltes an C-reaktivem Protein in Plasma, Serum oder ähnlichen Flüssigkeiten. Es wurden Überstände von PHH-Kulturen nach Stimulation mit Interleukinen auf den Gehalt an C-reaktivem Protein

untersucht. Dazu wurden die Überstände auf den PHH 48 h nach Stimulation mit Interleukin 1, 6 und 8 sowie PDBu entnommen und im ELISA analysiert.

Nachfolgend wird das Versuchsprinzip beschrieben:

Auf eine *Microwell*-Platte, auf der polyklonale, CRP-bindende f_{ab} -Fragmente von Ziegenantikörpern fixiert sind, wird ein löslicher, polyklonaler CRP-bindender Ziegenantikörper gegeben. Dieser ist mit der Peroxidase HRP gekoppelt (*Horse Radish Peroxidase*). Anschließend wird der CRP-haltige Leberzell-Überstand zugefügt und dadurch die immunologische Reaktion durch die Bindung von CRP an die fixen f_{ab} -Fragmente, sowie an die löslichen, HRP-gekoppelten Antikörper gestartet. Nach einem Waschvorgang und der nachfolgenden Zugabe der Peroxidasesubstrates TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) erfolgt unter Anwesenheit von H_2O_2 zunächst eine Blaufärbung der Lösung, die anschließende Zugabe von Schwefelsäure stoppt den enzymatischen Umsatz von TMB und färbt die Lösung in den *Microwells* schließlich nach gelb. Die Extinktion dieser Lösung wird bei einer Wellenlänge 450 nm im ELISA-Reader photometrisch gemessen und ist direkt proportional zur CRP-Konzentration im untersuchten Zellmaterial.

Durchführung:

Zuerst wurden die sechs CRP-Standards, die jeweils 0, 5, 10, 25, 50 und 100 ng CRP enthalten, nach folgendem Schema vorbereitet. Dazu wurden jeweils die in der Tabelle angegebenen Mengen an *CRP-Calibrator* und *Sample Diluent* gut miteinander vermischt. Die Standardlösungen sind bei Raumtemperatur für 8 Stunden stabil.

Tab 5: Pipettierschema zur Bestimmung von CRP Konzentrationen im ELISA. Jeweils eingesetzte CRP-Konzentrationen mit darauf abgestimmten Mengen an *CRP-Calibrator* und dem Verdünnungszusatz *Sample Diluent*.

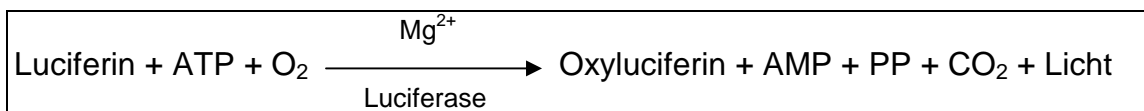
CRP-Konzentration	100 ng/ml	50 ng/ml	25 ng/ml	10 ng/ml	5 ng/ml	0 ng/ml
Volumen CRP-Calibrator	1,0 ml	0,50 ml	0,25 ml	0,10 ml	0,05 ml	0 ml
Volumen Sample Diluent	0 ml	0,50 ml	0,75 ml	0,95 ml	0,95 ml	1,0 ml

Nach Abziehen der Schutzfolie auf der *Mikrowell*-Platte wurde jedes der eingesetzten Wells zunächst mit je 200 μl /Well der Anti-human-CRP-Antikörperlösung mittels einer Multipipette und anschließend mit 50 μl /Well der Kontrollen bzw. der auf den CRP-Gehalt zu untersuchenden Überständen einzeln befüllt. Nach einstündiger Inkubation auf der Wippe bei Raumtemperatur wurde 3x mit je 300 μl /Well Waschpuffer gewaschen und nachfolgend 200 μl /Well des TMB – Substrates zugegeben. Nach 5 min Inkubationszeit wurde der Substratumsatz mit je 50 μl /well einer 0,45 N H_2SO_4 gestoppt und nach weiteren 10 min Stabilisierungszeit die Extinktion photometrisch gemessen. Die Ermittlung der Konzentration von CRP in den Überständen erfolgte rechnerisch an Hand einer Standardkurve.

2.2.8 Luciferase Assay

Mit Hilfe dieses Chemolumineszenz-Verfahrens lassen sich bestimmte Promotoraktivitäten in Zellkernen quantifizieren.

In der zugrunde liegenden Reaktion, bei der Energie in Form von Licht freigesetzt wird, katalysiert Luciferase die ATP-abhängige oxidative Decarboxylierung von Luciferin:



Die im Luminometer gemessene Luciferaseaktivität entspricht der transkriptionellen Aktivität im Zellkern.

Untersucht wurde die Aktivität des CRP-Promotors in siRNA-transfizierten und untransfizierten ABEK-14 Zellen, die 72 h nach Transfektion mit PDBu stimuliert wurden. Nach weiteren 24 h Inkubationszeit wurde der Versuch durchgeführt.

Zur Vorbereitung wurde das Medium auf den 24-Well Platten abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 100 μl /Well *Glow Lysis Buffer* und 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden unter dem Abzug 100 μl /Well *Bright Glow Assay Buffer* auf die Zellen gegeben und anschließend die Lysate blasenfrei in je ein Luminometer-Tube transferiert. Nach Einbringen der

Tubes inklusive eines Leerröhrchens in das Luminometer erfolgte die Messung bei 554 nm.

2.2.9 Statistik

Statistische Analysen wurden mit Hilfe der SigmaStat Software (Version 2,0) durchgeführt.

Zur Bestimmung der statistischen Signifikanz wurde der Student`s t-Test für verbundene Stichproben angewendet. Folgende Werte zur Signifikanz wurden festgelegt:

$p < 0,05$: statistisch signifikant (in Grafiken im Ergebnisteil als „*“ gekennzeichnet)

$p < 0,001$: statistisch hochsignifikant (in Grafiken im Ergebnisteil als „***“ gekennzeichnet)

3 Ergebnisse

3.1 Expression von Isoformen der Proteinkinase C in PHH

Primäre humane Hepatozyten von jeweils drei unterschiedlichen Spendern (siebenjährig, 53-jährig und 74-jährig) wurden nach 48 h Kultivierung wie in 2.2.4 beschrieben lysiert und die Proteinvolllysate im Western-Blot Verfahren auf den Gehalt an Proteinkinase C untersucht. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung der Geltaschen mit Protein wurde nach erfolgtem Membranstripping jeweils der Gehalt an α -Tubulin mitbestimmt. Es erfolgte ein qualitativer Nachweis der Isoformen PKC α , PKC β _I, PKC β _{II}, PKC γ , PKC δ und PKC ϵ mittels Western Blot.

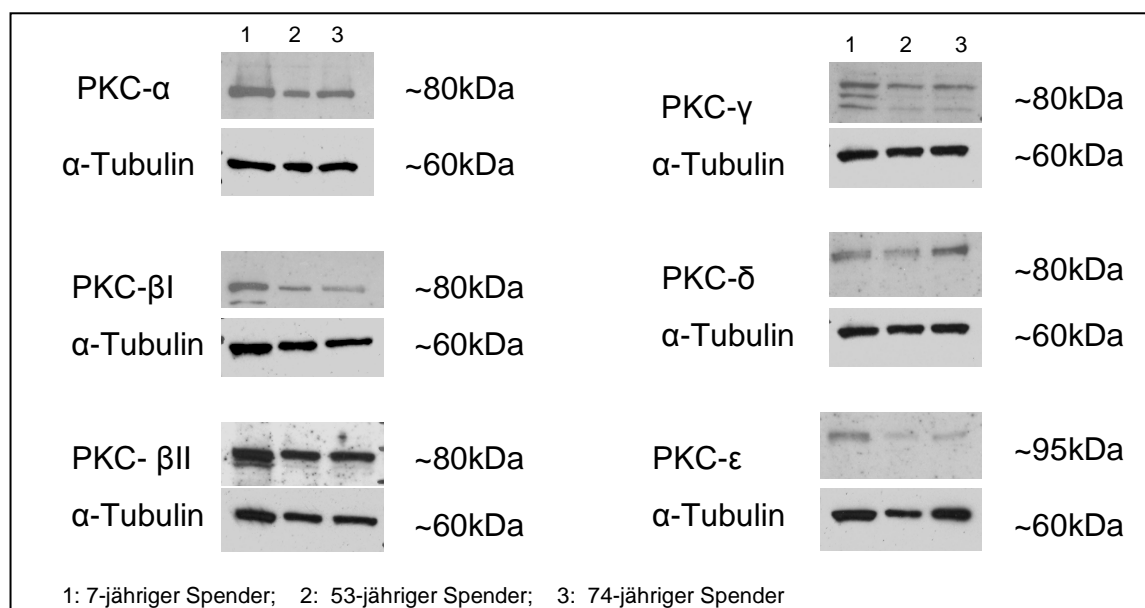


Abb. 7: Qualitativer Nachweis von Isoformen der Proteinkinase C (PKC) in primären humanen Hepatozyten mittels des Westernblot-Verfahrens.

Proteinvolllysate dreier Spender unterschiedlichen Alters im Vergleich (1,2,3). Nachgewiesen wurden die Proteinkinase C-Isoformen PKC α , PKC β _I, PKC β _{II}, PKC γ , PKC δ und PKC ϵ , jeweils mit Darstellung der Tubulin-Ladekontrollen (α -Tubulin). Angabe des Molekulargewichts der Proteine in der jeweiligen Bande in Kilodalton (kDa)

3.2 Änderung der CRP-Synthese in PHH nach Stimulation mit Interleukinen

Wie in 2.2.3.1 beschrieben, wurden PHH mit humanem Interleukin 1, 6 und 8 sowie PDBu (4 α -Phorbol 12,13-Dibutytrat) stimuliert, die Zellüberstände nach 48 h abgenommen und die darin enthaltene Menge an C-reaktivem Protein wie in 3.2.7 beschrieben im ELISA quantitativ bestimmt.

Eine signifikante Erhöhung der CRP-Syntheserate zeigte sich in Referenz zu unbehandelten Zellen, für Zellen, die mit Interleukin 6 stimuliert wurden. Es konnte keine signifikante Erhöhung der CRP-Syntheserate für IL-8 behandelte Zellen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse für drei Wiederholungsversuche mit Zellen von Spendern unterschiedlichen Alters und variierten Stimulationszeiten sind unten graphisch dargestellt.

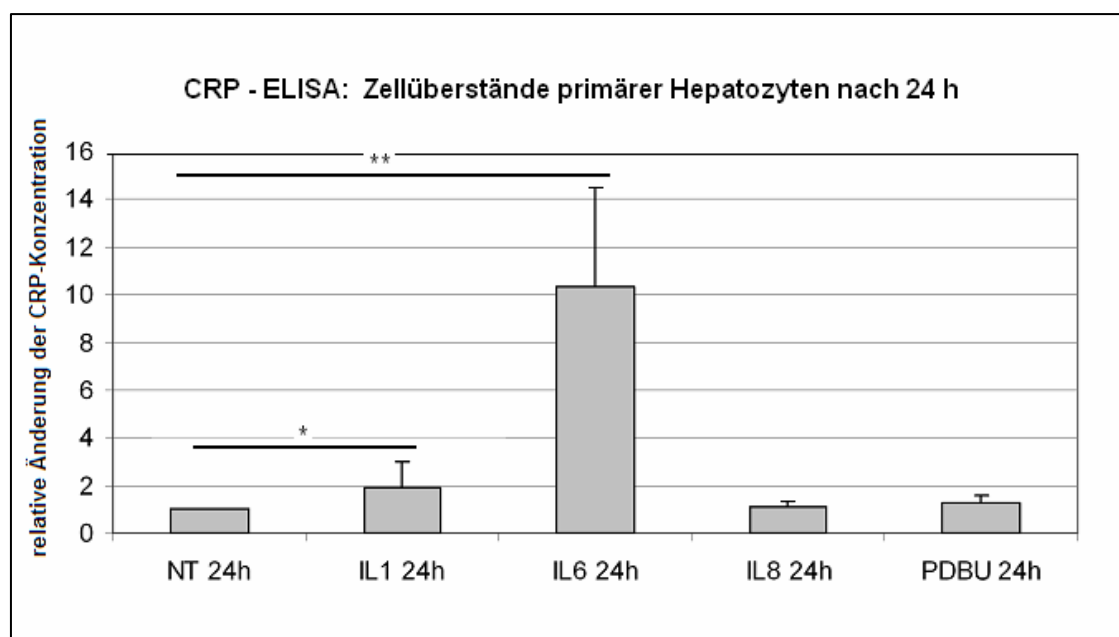


Abb. 8: Vergleich der relativen CRP-Konzentrationen in Zellüberständen primärer humaner Hepatozyten 24 h nach Stimulation mit Zytokinen.

IL-1, IL-6, IL8, PDBu (x-Achse) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (NT: non treated). Die y-Achse gibt die relative CRP-Konzentration in den analysierten Zellüberständen an. Es zeigt sich eine signifikante Steigerung der zellulären CRP-Expression nach Stimulation mit IL-1 (* $p=0,006$), eine hochsignifikante Steigerung unter IL-6 (** $p<0,001$), keine signifikante Erhöhung der CRP-Synthese für die übrigen Stimulanzen.

CRP: C-reactives Protein, IL: Interleukin, PDBu: 4 α -Phorbol 12,13-Dibutytrat

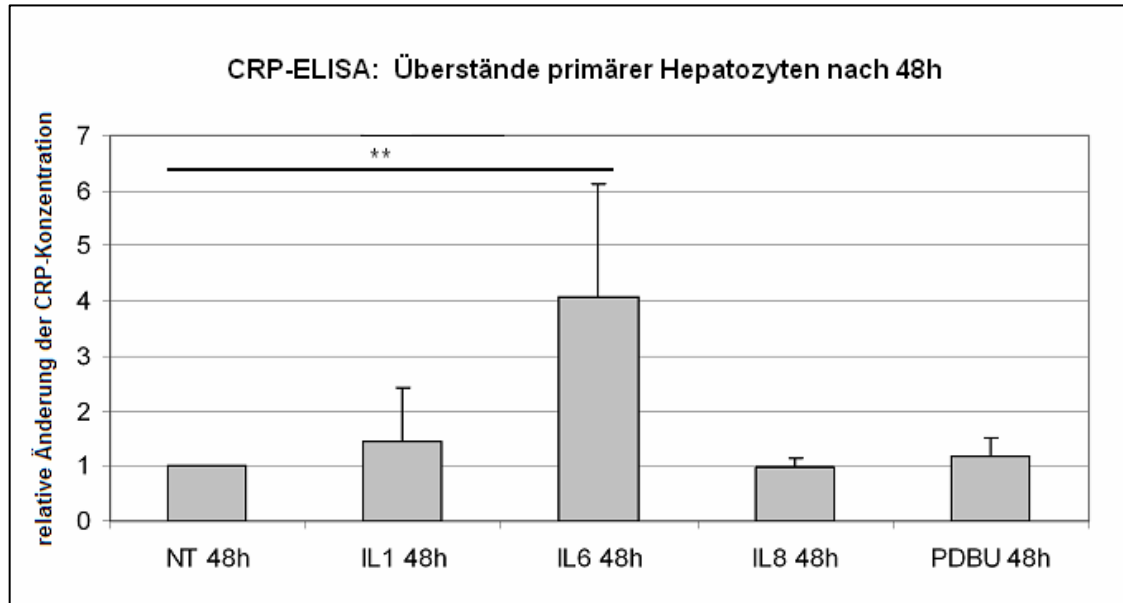


Abb. 9: Vergleich der relativen CRP-Konzentrationen in Zellüberständen primärer humaner Hepatozyten 48 h nach Stimulation mit Zytokinen.

IL-1 β , IL-6, IL8, PDBu im Vergleich zu unbehandelten Zellen (NT: non treated). Die y-Achse gibt die relative CRP-Konzentration in den analysierten Zellüberständen an. Es zeigt sich eine hochsignifikante Steigerung der zellulären CRP-Expression nach Stimulation mit IL-6 (** $p < 0,001$), keine signifikante Erhöhung der CRP-Synthese für die übrigen Stimulanzen.

CRP: C-reactives Protein, IL: Interleukin, PDBu: 4 α -Phorbol 12,13-Dibutyrat

3.3 Analyse der CRP-Promotoraktivität

Durch Transfektion mittels 50 nm siRNA wurde der für die PKC-Isoformen α und β_1 codierende Genabschnitt in ABEK-14-Zellen inaktiviert. 72 h nach Einschleusen der siRNA wurde durch Zugabe von 100 nm PDBu die Synthese der Proteinkinase C stimuliert. Nach weiteren 24 h Inkubationszeit wurden Proteinlysate sowohl für Analysen im Luciferase Assay und im Western-Blot angefertigt. Der Luciferase Assay diente zur quantitativen Bestimmung der CRP-Promotoraktivität in den zu untersuchenden ABEK14 Zellen. Zur Erfolgskontrolle des PKC-Knockdowns wurden zu jeder Versuchsreihe Proteinvolllysate aller Zellen einer Westernblot Untersuchung zugeführt und der zelluläre Gehalt an PKC qualitativ analysiert. Für beide untersuchten PKC-Isoformen (α und β_1) zeigten die PKC-Knockdownzellen im Vergleich zu Zellen, die mit nichtbindender (negativer) siRNA transfiziert wurden, eine geringere Aktivität des CRP-Promotors im Luciferase Assay. Insgesamt wurden für jede der beiden Isoformen je drei Versuche durchgeführt, die Daten aus den drei Wiederholungen statistisch analysiert und auf die Gesamtproteinmenge abgeglichen. Die Aktivitätsminderung des CRP-Promotors erwies sich für PKC β_1 -Knockdownzellen als statistisch signifikant.

Im Westernblot wurden je 30 μ g Protein der aus den Volllysaten der negativen und PKC komplementären siRNA-transfizierten Zellen eingesetzt. Für den immunologischen Nachweis der Proteine PKC α und β_1 wurden Erstantikörper in den Konzentrationen 1:1000 (PKC α) und 1:500 (PKC β_1) eingesetzt. Der erfolgreiche Knockdown der PKC-Isoform lässt sich anhand der Abschwächung der entsprechenden Banden für beide untersuchten Isoformen nachweisen. Zur Ladekontrolle diente α -Tubulin, die Banden sind in den unten angeführten Grafiken als Referenz mit angeführt.

Versuchsergebnisse zur PKC-Isoform α :

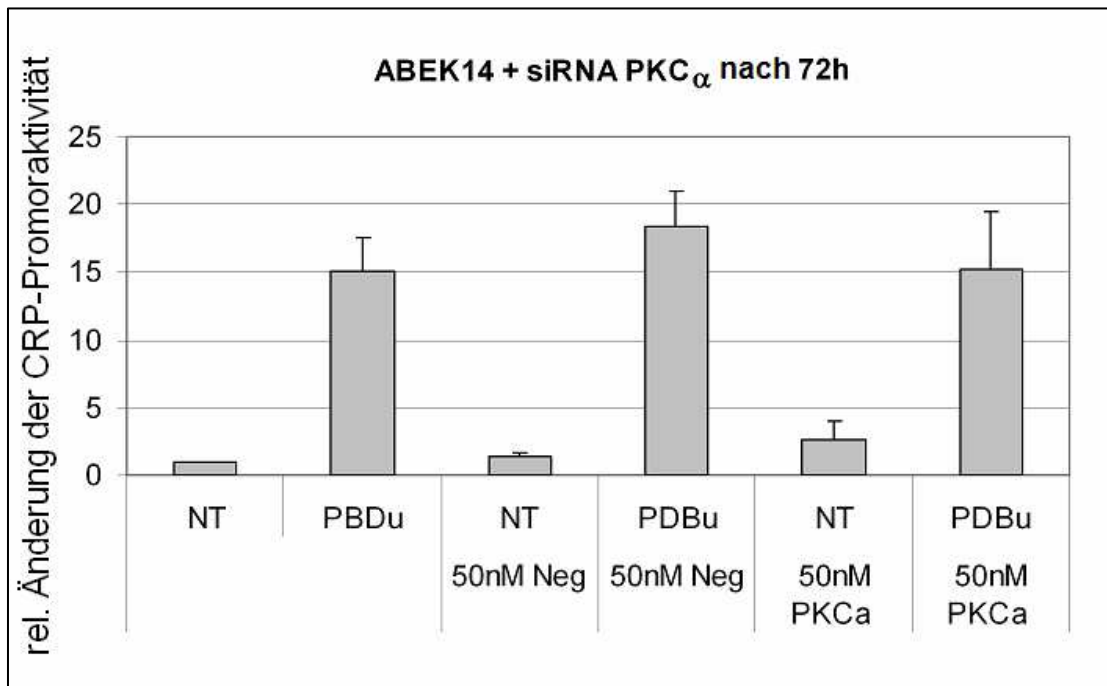


Abb. 10: Relative Änderung der CRP-Promotoraktivität bei PKC-Knockdownzellen. Knockdownzellen (PKC α) im Vergleich zu untransfizierten, und mit negativer siRNA transfizierten (Neg), ABEK-14-Zellen mit Angabe der Standardabweichung. Messung jeweils nach Stimulation mit PDBu und unbehandelt (NT: non treated). Im Vergleich zu Negativ-siRNA Zellen zeigen die PKC α -Knockdownzellen eine niedrigere Promotoraktivität, die sich als statistisch jedoch als nicht signifikant erwies.

CRP: C-reaktives Protein, Neg: negativ = nichtbindende siRNA, PDBu: PDBu: 4 α -Phorbol 12,13-Dibutyrate, PKC α : Proteinkinase C-Isoform β_1 , siRNA: small interfering Ribonukleinsäure

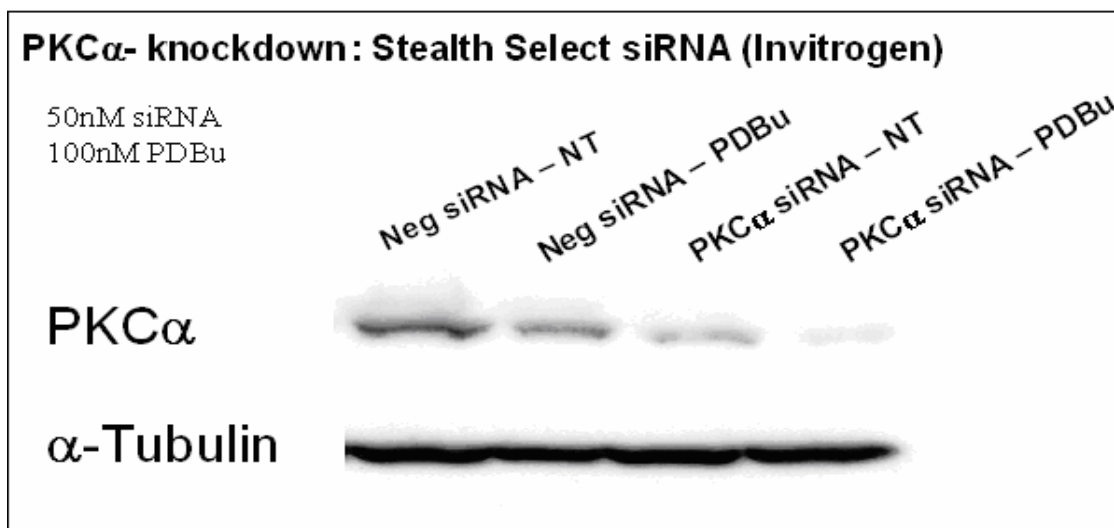


Abb. 11: Western-Blot zur Darstellung des PKC α -Knockdowns in ABEK-14 Zellen.

Für PKC α - transfizierte Zellen zeigt sich eine deutliche Abschwächung der Banden, die die verminderte Synthese der PKC α nach erfolgreichem Knockdown repräsentieren. Oben links: Eingesetzte Konzentrationen an siRNA und Stimulanz (PDBu). Unten links: Eingesetzte Antikörper (Anti-PKC α , Anti- α -Tubulin). Schräg: Kombination aus eingesetzter siRNA (PKC α , Neg=nicht bindende siRNA) und Stimulanz (PDBu, NT: non treated=unbehandelt).

PKC α : Proteinkinase C, Isoform α ; siRNA: small interfering Ribonukleinsäure

Versuchsergebnisse zur PKC-Isoform β_1 :

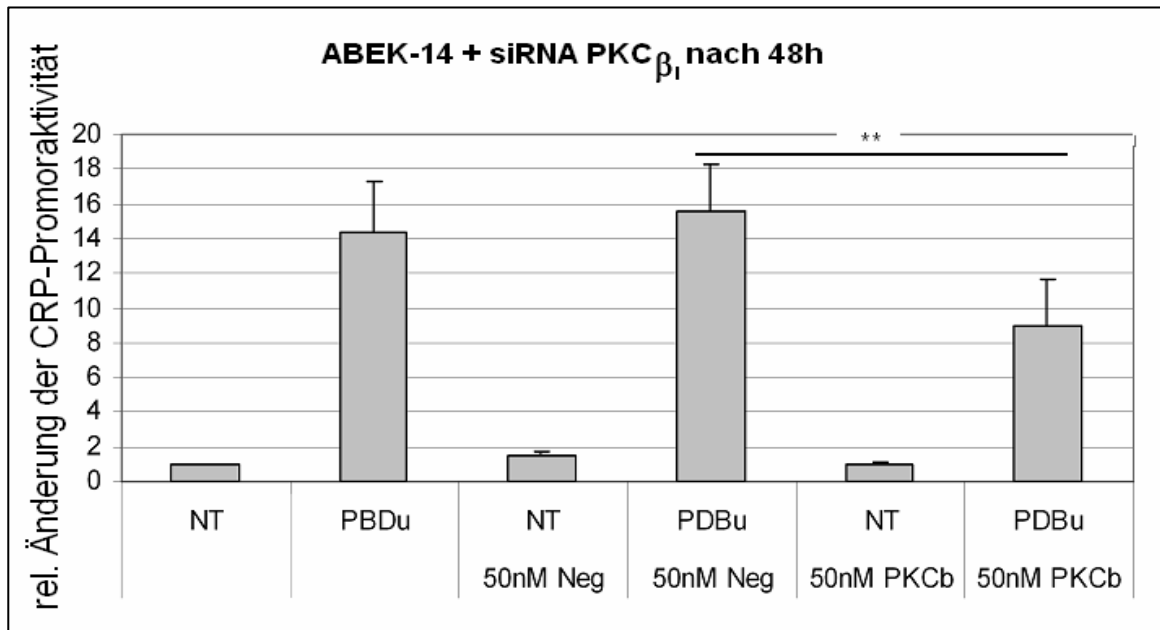


Abb. 12: Relative Änderung der CRP-Promotoraktivität bei PKC-Knockdownzellen
 Knockdownzellen ($\text{PKC}\beta_1$) im Vergleich zu untransfizierten, und mit negativer siRNA transfizierten (Neg), ABEK-14-Zellen mit Angabe der Standardabweichung. Messung jeweils nach Stimulation mit PDBu und unbehandelt (NT: non treated). Im Vergleich zu Negativ-siRNA Zellen zeigen die $\text{PKC}\beta_1$ -Knockdownzellen eine niedrigere Promotoraktivität, die sich als statistisch hochsignifikant erwies (** $p < 0.009$).
 CRP: C-reaktives Protein, Neg: negativ = nichtbindende siRNA, PDBu: PDBu: 4 α -Phorbol 12,13-Dibutyrate, $\text{PKC}\beta_1$: Proteinkinase C - Isoform β_1 , siRNA: small interfering Ribonukleinsäure.

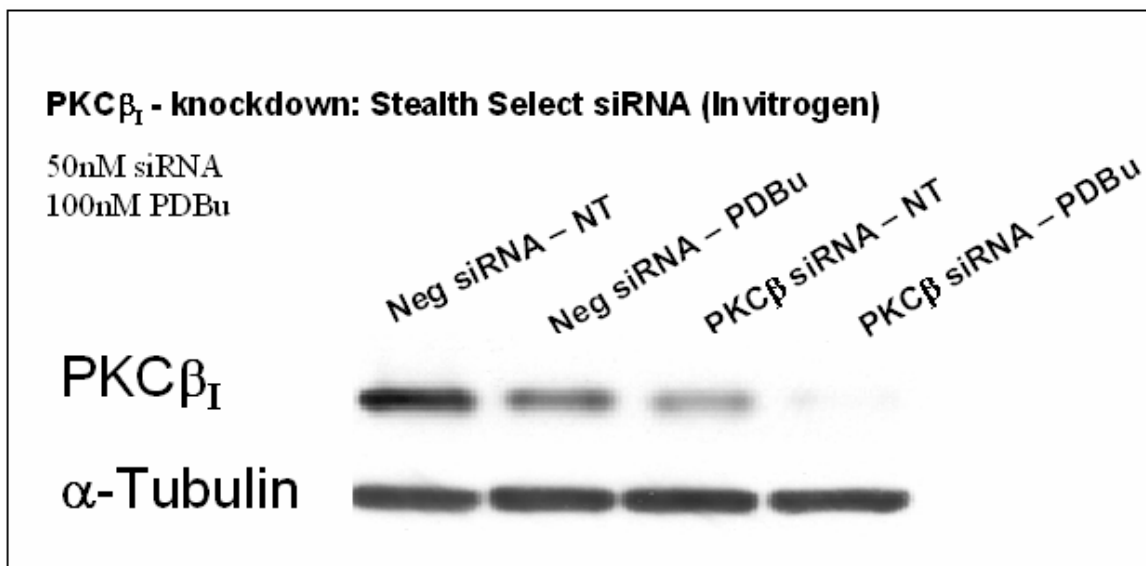


Abb. 13: Western-Blot zur Darstellung des $\text{PKC}\beta_1$ -Knockdowns in ABEK14 Zellen. Für -transfizierte Zellen zeigt sich eine deutliche Abschwächung der Banden, die die verminderte Synthese der $\text{PKC}\beta_1$ nach erfolgreichem Knockdown repräsentieren. Oben links: Eingesetzte Konzentrationen an siRNA und Stimulanz (PDBu). Unten links: Eingesetzte Antikörper (Anti- $\text{PKC}\beta_1$, Anti- α -Tubulin). Schräg: Kombination aus eingesetzter siRNA ($\text{PKC}\beta_1$, Neg=nicht bindende siRNA) und Stimulanz (PDBu, NT: non treated=unbehandelt).
 $\text{PKC}\beta_1$: Proteinkinase C - Isoform β_1 , siRNA: small interfering Ribonukleinsäure

4 Diskussion

4.1 CRP: Akute-Phase und atherogene Prozesse

Neben seiner wichtigen Funktion als Entzündungsmarker in der klinischen Praxis wird dem CRP heute eine entscheidende Rolle als Zielprotein für die Prognose und Therapie kardiovaskulärer Krankheiten, insbesondere der Arteriosklerose zugeschrieben. Die Arteriosklerose wird nach heutigem Kenntnisstand als ein inflammatorisches Geschehen verstanden, in das neben dem Komplementsystem, Entzündungszellen, oxidierten Lipidpartikeln und anderen Akute-Phase-Proteinen auch das C-reaktive Protein involviert ist. Der atherogene Effekt des CRP beruht vor allem auf seinen zahlreichen Wechselwirkungen mit dem humoralen und zellulären Immunsystem.

Ausschlaggebend für diese Erkenntnis war in erster Linie der erfolgreiche Nachweis von CRP in intimalen Läsionen, der nach kontroversen Diskussionen über die Rolle des CRP in der Atherogenese erstmals 1998 gelang [67]. Nach und nach wurden pathophysiologische Mechanismen entschlüsselt, die die Funktion des CRP in der Entstehung der arteriosklerotischen Läsionen darlegen. Die Tatsache, dass CRP zur Komplementaktivierung führt [70,72] und gleichzeitig ein vermindertes Auftreten der Arteriosklerose bei C6-defizienten Tieren dargelegt wurde [14,54] zeigt den Zusammenhang zwischen dem CRP und der komplementvermittelten Inflammation in der Gefäßwand. Der Nachweis terminaler Komplementkomplexe in intimalen Läsionen bei Tieren mit Hypercholesterinämie [63] zusammen mit der bewiesenen Kolo-kalisation des Komplementproteins C5b und CRP in menschlichen Koronarplaques [67] untermauert die These der CRP-getriggerten Komplementaktivierung im Rahmen der Atherogenese.

Durch Bindung an niedrigaffine Immunglobulinrezeptoren vom FcγRIIa-Typ regt CRP Zellen des mononuklearen phagozytierenden Systems (MPS) zur Aufnahme biologischer Fremdpartikel an und hat damit einen stimulierenden Einfluss auf unspezifische, zelluläre Abwehrmechanismen [5]. Zusammen mit der Oponisierung oxidiertes LDL-Lipoproteine begünstigt CRP somit in zweifacher Weise die Genese von Schaumzellen in vaskulären lipidreichen Plaques, den so

genannten „fatty streaks“[42,4,12]. Zudem löst die CRP-Bindung an Fc-Rezeptoren auf Makrophagen und Monozyten in diesen Zellen die Freisetzung einer Vielzahl an proinflammatorischen Zytokinen aus. Dadurch folgt eine Permeabilitäts-erhöhung des Endothels mit chemotaktisch begünstigter Einwanderung weiterer Entzündungszellen und Fibroblasten.

Aufgrund der Vielzahl der pathophysiologischen Interaktionen des C-reaktiven Proteins im Zusammenhang mit der Atherogenese wurden bereits mehrere Strategien zur Blockade seiner Funktionen in Erwägung gezogen. Betrachtet man die Vielzahl der Endstrecken, scheint neben einer Drosselung der CRP-vermittelten Komplementaktivierung und dem Antagonismus an CRP-Rezeptoren vor allem die Inhibition bereits auf Syntheseebene den größten Erfolg zu versprechen [36,32,33].

4.2 Die hepatische CRP-Synthese – Möglichkeiten der Modulation

4.2.1 Der IL-1 und IL-6 -vermittelte pathway

Das C-reaktive Protein wird primär in humanen Hepatozyten synthetisiert. Die Zytokine IL-1 β und IL-6 werden von Monozyten und Makrophagen ausgeschüttet und nehmen eine wichtige Vermittlerfunktion zwischen Zellen des Immunsystems und dem hepatischen Proteinbiosyntheseapparat ein. Kommt es zu deren Ausschüttung in Folge inflammatorischer Reize wie Trauma, Infekt oder Nekrose, wird die Synthese von Akutphase-Proteinen in der Leber angetrieben. [62,31,59,29,74,25] Nach Bindung von IL-6 an Rezeptoren auf der Oberfläche von Hepatozyten wird ein komplexer intrazellulärer Signaltransduktionsweg gestartet, an diesem sind unter anderem Transkriptionsfaktoren der STAT und C/EBP-Familie sowie der nukleäre Faktor κ B (NF- κ B) beteiligt [23].

Da in diversen Zellen die NF- κ B – Aktivierung eine Beteiligung des Proteinkinase C- (PKC) pathways voraussetzt, wurde vermutet, dass die PKC ebenso in den Syntheseweg des C-reaktiven Proteins involviert ist [23].

Die hier durchgeführten Stimulationsversuche an primären humanen Hepatozyten bestätigen einen stimulierenden Einfluss von IL-1 β und IL-6 auf die CRP-Synthese. In Konzentrationen von je 10 ng/ml Zytokin konnte mit Hilfe des hochsensitiven ELISA sowohl nach 24 h als auch nach 48 h Stimulationszeit eine Zunahme der CRP-Konzentration in Zellüberständen von PHH nachgewiesen werden. IL-1 β und IL-6 stellen somit direkte Aktivatoren der hepatischen CRP-Synthese dar. Eine pharmakotherapeutische Option, um eine Senkung des CRP-Plasmaspiegels zu erreichen, stellt vermutlich die Therapie mit Fibraten dar. So konnte in vitro die signifikante Drosselung der IL-1 vermittelten CRP Synthese nach Behandlung primärer Hepatozyten mit Fenofibrat erzielt werden [24].

4.2.2 PKC und CRP – neue Ansätze zum Verständnis des Synthesewegs

Im Jahr 2004 wurde erstmals eine Beteiligung des PKC-pathway an der transkriptionellen Regulation der CRP-Synthese in humanen Leberzellen aufgezeigt [65].

Eine Steigerung der CRP Expression nach Stimulation der ABEK-14 Zellreihe und der PHH (in zwei Einzelversuchen) mit 50-100 nmol des PKC-Aktivators PDBu bekräftigt die Vermutung, dass PKC-Isoformen in die hepatische CRP-Synthese involviert sind.

In dieser Arbeit sollte nun zunächst entschlüsselt werden, über welche PKC-Isoformen die menschliche Leberzelle verfügt. Mittels des Westernblotverfahrens konnten die Isoformen α , β_I , β_{II} , γ , δ und ϵ in Proteinvolllysaten aus primären humanen Hepatozyten isoliert werden.

Weiterhin sollte mit Hilfe des ABEK-14 Zellmodells über einen Knockdown diverser PKC-Isoformen ein Gen-silencing des CRP-Promotors erreicht werden, um Hinweise zu erhalten, über welche Isoform im Speziellen die zelluläre Signaltransduktion im Rahmen der CRP-Synthese abläuft. Hierbei gelang es, nach Einschleusen kleiner RNA-Moleküle (siRNAs) in einen Teil der modifizierten Hepatomzellen, einen erfolgreichen Knockdown der PKC-Isoformen α und β_I zu

evozieren. Nach anschließender Stimulation mit dem PKC-Aktivator PDBu zeigte sich mit Hilfe des Luciferase-Assay-Verfahrens eine signifikant verminderte Aktivität des CRP-Promotors in PKC β_1 -Knockdown-Zellen im Vergleich zu untransfizierten Zellen. Dies weist auf eine Beteiligung der PKC-Isoform β_1 in den Signaltransduktionsweg der Biosynthese des C-reaktiven Proteins in ABEK-14 Zellen hin.

In Westernblot-Untersuchungen konnten in primären Hepatozyten die PKC-Isoformen α , β_1 , β_{II} , γ , δ und ϵ detektiert werden. Von Interesse war weiterhin die Frage, welche spezielle Isoform an den Regulationsmechanismen der CRP-Synthese in Hepatozyten beteiligt ist. Mit Hilfe des ABEK-14 Zellmodells sollte diese Frage beantwortet werden. Transfektion von PKC α und β_1 -komplementärer siRNA in die Zellen führte zum Knockdown der PKC-Isoformen, die anschließende Stimulation mit dem PKC-Aktivator PDBu führte zu signifikant erniedrigter CRP-Promotoraktivität in PKC β_1 -transfizierten Zellen. Für PKC α -transfizierte Zellen konnte eine nicht signifikante Minderung der Aktivität des CRP-Promotors erzielt werden. Diese Ergebnisse lassen auf eine Beteiligung des PKC β_1 -Pathway in die CRP-Synthese in ABEK-14-Hepatomzellen schließen. Ob sich diese Erkenntnis auch auf primäre Hepatozyten übertragen lässt, ob also die CRP-Synthese auch in vivo über PKC β_1 reguliert wird, ist zu diskutieren. Hepatomzellen weisen Unterschiede in ihren physiologischen Eigenschaften im Vergleich zu nativen Zellen auf. Strukturproteine, Enzyme und Rezeptoren der Zellmembran, des Zytosols sowie des Zellkerns unterscheiden sich bezüglich Aufbau, Anzahl und Aktivität erheblich.

4.2.3 IL-8: Stimulator des PKC-vermittelten Synthesewegs?

Zudem war von Interesse, ob neben der bekannten Aktivierung über IL-1 β sowie IL-6, die speziell über den PKC-pathway vermittelte CRP-Synthese von Interleukin 8 stimuliert wird. Als Therapeutikum für Arteriosklerose-Patienten mit erhöhten CRP-Werten stand die Entwicklung eines IL-8-Antagonisten zur Unterdrückung der IL-8 vermittelten CRP-Synthese im Raum, dazu sollte die Hypothese zu IL-8 als physiologischer Stimulus auf die CRP-Synthese erhärtet werden. Nach Stimulation der Hepatozyten mit den Zytokinen IL-1 β , 6 und 8, sowie dem PKC-

Aktivator PDBu und anschließender Untersuchung der Zell-Überstände auf die CRP-Konzentrationen konnte im ELISA zwar die bereits bekannte Synthesesteigerung für IL-1 β sowie IL-6 aufgezeigt werden, eine Steigerung der CRP-Synthese nach Behandlung mit IL-8 konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Obwohl in vorausgegangenen Versuchsreihen anderer Forschungsgruppen ein stimulierender Einfluss von IL-8 auf die CRP-Freisetzung in PHH dokumentiert wurde [23,71], bestätigten die Ergebnisse dieser Arbeit diesen Zusammenhang nicht. Für IL-8 konnte in zahlreichen Versuchsreihen keine signifikante Erhöhung der CRP-Konzentration in Zellüberständen stimulierter PHH erreicht werden. Betrachtet man diese Ergebnisse, scheidet die Antagonisierung von IL-8 am Rezeptor als therapeutische Option zur Senkung des Serum-CRP Spiegels aus, bzw. erscheint zumindest fragwürdig. Variable Stimulationszeiten (12 h , 24 h, 48 h) führten zu keiner signifikanten Steigerung der Konzentration von CRP in den untersuchten Zellüberständen. Dieser Widerspruch zu früheren Untersuchungen mag in der großen Varianz der verwendeten Zellsuspensionen begründet sein. Cryokonservierte Zellen von Spendern verschiedenen Alters unterscheiden sich in ihren Eigenschaften. Insbesondere muss berücksichtigt werden, dass käufliche primäre Hepatozyten Lebern entstammen, die entweder post mortem, bzw. bei Leberteileresektionen erkrankten Spendern entnommen werden. Leberzellen, die z.B. tumor Erkrankten Patienten entstammen, weisen häufig Abweichungen in der Genexpression auf und entsprechen daher nur noch bedingt dem ursprünglichen Bauplan der menschlichen Leberzelle. Bei den Spendern handelt es sich zudem häufig um hospitalisierte Patienten, die vor Entnahme des relevanten Zellmaterials einer intensiven Polypharmakotherapie ausgesetzt waren, die besonders in Geweben der Leber beträchtliche strukturelle Veränderungen bezüglich des Erbmateriale und damit der Protein- und Enzymzusammensetzung mit sich bringt. Daher zeigten sich nach der Ausplattierung häufig beträchtliche Unterschiede in der Zelldichte verschiedener Spenderzellen. Zudem variiert die Rezeptordichte für IL-8 auf der Zellmembran, ebenso treten Abweichungen bezüglich der Eigenschaften des Proteinbiosyntheseapparates, der intrazellulären Enzymkonstellation, der Proteinkonzentrationen und damit letztlich der gesamten

intra- und interzellulären Regulations- und Modulationsmechanismen in Hepatozyten verschiedener Spender auf und müssen berücksichtigt werden.

Eine Degradation von exogen zugeführten Stimulanzen, wie auch IL-8 durch zelluläre oder exogene Proteasen im Rahmen der Versuchsreihen, kann weiterhin in Erwägung gezogen werden.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen systemischer, inflammatorischer Prozesse kommt es zur Ausschüttung von Akute-Phase-Proteinen, die zur endogenen Regulation des Entzündungsprozesses dienen und eine Vermittlerfunktion zwischen Elementen des Immunsystems und den verschiedenen peripheren Geweben des Körpers sowie ihrer versorgenden Blutgefäße einnehmen.

Eine wichtige Rolle kommt dabei dem C-reaktiven Protein (CRP) als Prototypen eines Akute-Phase-Proteins zu, das nach seiner Bildung durch den Biosyntheseapparat der Leberzellen in das Blutplasma abgegeben wird und an zahlreichen Mechanismen der Modulation von Inflammationsprozessen beteiligt ist.

Ein Anstieg der Plasmakonzentration von CRP dient als laborchemischer Marker zur Detektion von entzündlichen Prozessen in der klinischen Routine und wird zudem seit einiger Zeit als Prädiktor für das zukünftige kardiovaskuläre Risiko herangezogen. Während der Zirkulation durch den Intravasalraum interagiert das CRP mit Strukturen der Gefäßwand und mit fluktuierenden und lokalen Entzündungszellen. Dadurch wird es zum Induktor proatherogener Vorgänge. Durch die Eigenschaft, Entzündungsvorgänge in der Arterienwand zu induzieren, stellt CRP einen erheblichen Risikofaktor für die Arteriosklerose dar und wird zum potenziellen Angriffspunkt pharmakotherapeutischer Interventionen im Hinblick auf das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse.

Das Fehlen hinreichender Kenntnisse über die genauen Bindungsrezeptoren für C-reaktives Protein in atherogenen Prozessen lässt die Inhibition auf Syntheseebene des CRPs als besonders effektiven Weg zur Senkung des Arterioskleroserisikos erscheinen. In dieser Arbeit wurde der Proteinkinase C-Signalweg als wichtiges Instrument zur Weitergabe des Entzündungsstimulus und Vermittler zwischen Entzündungsreaktion und CRP-Synthese bestätigt. Die Triebkraft für die Proteinkinase C-vermittelte CRP-Synthesesteigerung scheint nach den Ergebnissen voriger wissenschaftlicher Arbeiten Interleukin 8 (IL-8) zu sein, was jedoch aus Gründen zellulärer Variabilität primärer humaner Hepatozyten in dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte. Initial wurden zunächst die potenziell in den CRP-Syntheseweg involvierten PKC-Isoformen in

primären Hepatozyten isoliert. Als relevante biochemische Isoform konnte mittels Gen-silencing über siRNAs (small interfering RNA), die PKC β_1 (Proteinkinase C, Isoform Beta-2) im CRP-Luciferase-HepG2-Zellkonstrukt (ABEK-14, eine modifizierte Hepatomzelllinie) detektiert werden. Eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf primäre Hepatozyten liegt auf Grund genomischer Ähnlichkeiten sowie Parallelen im Aufbau des Biosyntheseapparates dieser Zellen nahe.

Es ist also zusammenfassend davon auszugehen, dass der gentechnologische „knock-down“ der PKC-Isoform PKC β_1 mittels siRNAs, die Blockade eines wichtigen Elementes im CRP-Syntheseweg ermöglicht, und über diesen Mechanismus zumindest in vitro eine Senkung der CRP-Syntheserate erzielt werden kann.

6 Literaturverzeichnis

1. Benditt EP, Benditt JM: Evidence for the monoclonal origin of human atherosclerotic plaques.
Proceedings of the National Academy of Sciences, 70: 1753-1756 (1973)
2. Berliner JA, Heinecke JW: The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radical Biology & Medicine*, 20: 707-727 (1996)
3. Berliner JA, Turrito MC, Sevanian A, Ramin S, Kim A, Bamshad B, Esterson M, Fogelman AM: Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions.
Journal of Clinical Investigation, 85: 1260-1266 (1990)
4. Bhakdi S, Torzewski M, Klouche M, Hemmes M: Complement and atherogenesis: binding of CRP to degraded, nonoxidized LDL enhances complement activation.
Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology, 19: 2348-2354 (1999)
5. Bharadwaj D, Stein MP, Volzer M, Mold C, Du Clos TW: The major receptor for C-reactive protein on leukocytes is Fc γ Receptor II.
Journal of Experimental Medicine, 190: 585-590 (1999)
6. Brown MS, Goldstein JL: Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis.
Annual Review of Biochemistry, 52: 223-261 (1983)
7. Cathcart MK, Morel DW, Chiolm GM: Monocytes and neutrophils oxidize low-density lipoprotein making it cytotoxic.
Journal of Leukocyte Biology, 38: 341-350 (1985)
8. Cushirig, SD, Berliner JA, Valente AJ, Turrito MC, Navab M, Parhami F, Gerrity R, Schwartz C, Fogelman AM: Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells.
Proceedings of the National Academy of Sciences, 87: 5134-5138 (1990)
9. 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.
New England Journal of Medicine, 350: 1387-1397 (2004)

10. Endemann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT, Protter AA: CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, 268: 11811-11816 (1993)
11. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults: Executive summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *Journal of the American Medical Association*, 285: 2486-2497 (2001)
12. Fu T, Borensztajn J: Macrophage uptake of LDL bound to aggregated C-reactive protein. Possible mechanism of foam cell formation in atherosclerotic lesions. *Biochemical Journal*, 366: 195-201 (2002)
13. Gabay C, Kushner I: Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *New England Journal of Medicine*, 340: 448-454 (1999)
14. Geertinger P, Soerensen H: On the reduced atherogenic effects of cholesterol feeding on rabbits with congenital complement (C6) deficiency. *Artery*, 1: 177-184 (1977)
15. Gil J, Esteban M: Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis*, 5: 107-114 (2000)
16. Goldstein JL, Ho YK, Bosu SK, Brown MS: Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76: 333-337 (1979)
17. Goldstein JL, Brown MS: The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annual Review of Biochemistry*, 46: 897-930 (1977)
18. Goldstein JL, Hazzard WR, Schrott HG, Biermann EL, Motulsky AG: Hyperlipidemia in coronary heart disease. Lipid levels in 500 survivors of myocardial infarction. *Journal of Clinical Investigation*, 53: 1533-1548 (1973)
19. Gomez-Lechon MJ, Donato MT, Castell JV, Jover R: Human hepatocytes as a tool for studying toxicity and drug metabolism. *Current Drug Metabolism*, 4: 292-312 (2003)
20. Hansson GK, Holm J, Kral IG: Accumulation of IgG and complement factor C3 in human arterial endothelium and atherosclerotic lesions. *Acta Pathologica Microbiologica Immunologica Scandinavica*, A92: 429-435 (1984)

21. 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: 462-466 (1997)
22. Ilhan F, Akbulut H, Karaca I, Godekmerdan A, Ilkay E, Bulut V. Procalcitonin, c-reactive protein and neopterin levels in patients with coronary atherosclerosis. *Acta Cardiologica* 60: 361-52 (2005)
23. 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. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 25: 186-192 (2005)
24. Jessup W: Oxidized lipoproteins and nitric oxide. *Current Opinion in Lipidology*, 7: 274 – 280 (1996)
25. 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-NfkapB-C/EBP-beta complex formation. *Blood*, 101: 545-551 (2003)
26. Koenig W, Sund M, Fröhlich M, Fischer HG, Lowel H, Doring A, Hutchinson WL, Pepys MB. C-reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation*, 99: 237-242 (1999)
27. Kume N, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr: Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *Journal of Clinical Investigation*, 90: 1138-1144 (1992)
28. Kurrek, J: Antisense technologies, Improvement through novel chemical modifications, *European Journal of Biochemistry*, 45: 1628-1644 (2003)
29. Li SP, Goldmann ND. Regulation of human C-reactive protein gene expression by two synergistic IL-6 responsive elements. *Biochemistry*, 35: 9060-9068 (1996)
30. Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, Grillo RL, Rebuffi AG, Pepys MB, Maseri A: The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *New England Journal of Medicine*, 331: 417-424 (1994)

31. Majello B, Arcone R, Toniatti C, Ciliberto G: Constitutive and IL-6 induced nuclear factors that interact with the human C-reactive protein promoter. *The EMBO Journal*, 9: 457-465 (1990)
32. Manolov DE, Koenig W, Hombach V, Torzewski J: C-reactive protein and atherosclerosis—is there a causal link? *Histology and Histopathology*, 18: 1189-1193 (2003)
33. Manolov DE, Roecker C, Hombach V, Nienhaus GU, Torzewski J. Ultrasensitive confocal fluorescence microscopy of C-reactive protein interacting with FcRIIa. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 24: 2372-2377 (2004)
34. Martin GM, Sprague CA: Clonal senescence and atherosclerosis. *Lancet*, 11: 1370-1371 (1972)
35. Meister G. and Tuschl T: Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 16: 343-349 (2004)
36. Mortensen RF: C-reactive protein, inflammation, and innate immunity. *Immunological Research*, 24: 163–176 (2001)
37. Newman HAI, Zilverman DB: Quantitative aspects of cholesterol flux in rabbit atheromatous lesions . *Journal of Biological Chemistry*, 237 : 2078-2093 (1962)
38. 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)
39. Nieminen, M.S ., K. Mattila, and V. Valtonen: Infection and inflammation as risk factors for myocardial infarction. *European Heart Journal*, 14: 12-16 (1993)
40. Nishizuka Y: The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature*, 334: 661-665 (1988)
41. Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET: Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation*, 102: 2165-2168 (2000)
42. Pepys MB, Rowe IF, Baltz ML. C-reactive protein: binding to lipids and lipoproteins. *International Review of Experimental Pathology*, 27: 83-111 (1985)

43. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH: Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *New England Journal of Medicine*, 336: 973-979 (1997)
44. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N: C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *New England Journal of Medicine*, 342: 836-843 (2000)
45. 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. *New England Journal of Medicine*, 347: 1557–1156 (2002)
46. Ritzeler O, Stilz U, Neises B, Jaehne G, Habermann J: Benzimidazoles. *Deutsche Patent Nummer: DE 19928424 - A1* (2000)
47. Ron D, Kazanietz M: New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *FASEB Journal* 13: 1658-1676 (1999)
48. Ross R, Glomset JA: Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: proliferation of smooth muscle cell is a key event in the genesis of the lesion of atherosclerosis. *Science*, 180: 1332-1339 (1973)
49. Ross R: Mechanisms of disease: Atherosclerosis - An inflammatory disease. *New England Journal of Medicine*, 340: 115-126 (1999)
50. Ross R: Atherosclerosis is an inflammatory disease. *American Heart Journal*, 138: 419-420 (1999)
51. Ross R: Cell biology of atherosclerosis. *Annual Review of Physiology*, 57: 791-804 (1995)
52. Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 362: 801-809 (1993)
53. Ross, R: The pathogenesis of atherosclerosis: an update *New England Journal of Medicine*, 314: 488-500 (1986)
54. Schmiedt W, Kinscherf R, Deigner HP, Kamencic H, Nauen O, Kilo J, Oelert H, Metz J, Bhakdi S: Complement C6 deficiency protects against diet-induced atherosclerosis in rabbits. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 18: 1790-1795 (1998)
55. Schwenke DC, Carew TE: Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. Focal increases in arterterial LDL concentration precede development of fatty streak lesions. *Arteriosclerosis*, 9: 895-907 (1989)

56. Schwenke DC, Carew TE: Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits . II. Selective retention of LDL vs. selective increase in LDL permeability in susceptible sites of arteries. *Arteriosclerosis*, 9: 908-918 (1989)
57. Seifert PS, Hugo F, Hansson GK, Bhakdi S: Prelesional complement activation in experimental atherosclerosis: terminal C5b-9 complement deposition coincidences with cholesterol accumulation in the aortic intima of hypercholesterolemic rabbits. *Laboratory Investigation*, 60: 747-757 (1989)
58. Storz P, Doppler H, Johannes FJ, Toker A: Tyrosine Phosphorylation of Protein Kinase D in the Pleckstrin Homology Domain Leads to Activation *Journal of Biological Chemistry*, 278: 17969-17976 (2003)
59. Taylor AW, Ku NO, Mortensen RF: Regulation of cytokine-induced human C-reactive protein production by transforming growth factor-beta. *Journal of Immunology*, 145: 2507-2513 (1990)
60. Territo MC, Berliner JA, Navab M: Cellular interactions of the arterial wall in Molecular Genetics of Coronary Artery Disease. Candidate Genes and Processes in Atherosclerosis. *Monographs in Human Genetics*, 14: 18-34 (1992)
61. Tillet WS, Francis T: Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *Journal of Experimental Medicine*, 52: 561-571 (1930)
62. Toniatti C, Demartis A, Monaci P, Nicosia A, Ciliberto G: Synergistic transactivation of the human C-reactive protein promoter by transcription factor HNF-1 binding at two distinct sites. *The EMBO Journal*, 9: 4467-4475 (1990)
63. Torzewski J, Bowyer DE, Waltenberger J, Fitzsimmons C: Processes in atherogenesis: Complement activation. *Atherosclerosis*, 132: 129-136 (1997)
64. 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. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 16: 673-677 (1996)
65. Torzewski J, Torzewski M, Bowyer DE, Frohlich 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. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 18: 1386-1392 (1998)

66. 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.
Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 20: 2094-2099 (2000)
67. 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 -actin in early atherosclerotic lesions.
Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 17: 2448-2452 (1997)
68. Trautwein C, Caelles C, van der Geer P, Hunter T, Karin M, Chojkier M: Transactivation by NF-IL6/LAP is enhanced by phosphorylation of its activation domain. *Nature*, 364: 544-547 (1993)
69. Vlaicu R, Rus HG, Niculescu F, Cristea A: Immunoglobulins and complement components in human aortic atherosclerotic intima.
Atherosclerosis, 55: 35-50 (1985)
70. Volanakis JE: Complement activation by C-reactive protein complexes.
Annals of the New York Academy of Sciences, 389: 235-250 (1982)
71. Wigmore SJ, Fearon KC, Maingay JP, Lai PB, Ross JA: Interleukin-8 can mediate acute-phase protein production by isolated human hepatocytes.
American Journal of Physiology, 273: 720 – 726 (1997)
72. 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.
Journal of Immunology, 157: 473-479 (1996)
73. Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL: Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques.
American Journal of Pathology, 158: 1039-1051 (2001)
74. Zhang D, Sun M, Samols D, Kushner I: STAT3 participates in transcriptional activation of the C-reactive protein gene by interleukin-6.
Journal of Biological Chemistry, 271: 9503-9509 (1996)

7 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. med. V. Hombach für seine freundliche Unterstützung und die Ermöglichung meiner Dissertation. Ich bedanke mich für die Bereitstellung der finanziellen Mittel und der nötigen Laborräume für die Durchführung der Experimente dieser Arbeit im Rahmen des Sonderforschungsbereiches (SFB) 451 („Läsionen und Reparationen am kardiovaskulären System“).

Insbesondere möchte ich meinen Dank Herrn Professor Dr. med. M. phil. Jan Torzewski aussprechen, der mich auf dem gesamten Weg zu meiner Promotion jederzeit tatkräftig unterstützte, mir stets motivierend, hilfsbereit und ideenreich zur Seite stand und immer ein offenes Ohr für alle meine Probleme und Fragen hatte. Auch danke ich ihm für die Ermöglichung dieser Arbeit durch die Überlassung des Themas und das Bereitstellen der notwendigen Räumlichkeiten, Geräte und Materialien.

Bedanken möchte ich mich weiterhin bei Frau M. Bienek, Frau Dr. biol. hum. Juliane Wiehe und Herrn Dr. biol. hum. Dimitar Manolov für die freundliche Unterstützung und die sehr gute Atmosphäre im Labor.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Andrea Bucher für ihre zuvorkommende und nette Betreuung, für die überaus fachkundige, geduldige und detaillierte Einführung in die praktische Labortätigkeit und ihre stete Hilfsbereitschaft bei der Durchführung aller meiner experimentellen Arbeiten sowie bei der Datenauswertung.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir mein Studium und meinen gesamten Werdegang ermöglicht haben.

8 Lebenslauf

Name:		Johannes Müller
Geburtsdatum:		22.03.1981
Geburtsort:		Würzburg
Staatsangehörigkeit:		Deutsch
Familienstand:		ledig
Hochschulbildung:	10/2001 – 06/2008	Studium der Humanmedizin Universität Ulm
Schulbildung:	1991 - 2000	Dossenberger Gymnasium Günzburg
Zivildienst:	10/2000 – 09/2001	Kreiskliniken Günzburg- Krumbach Qualifikation zum Pflegehelfer
Famulaturen:	03/2004 – 04/2004	Gemeinschaftspraxis Dres. med. Holker/Lunz/Matsui Fachärzte für Urologie Günzburg
	09/2004 – 10/2004	Bundeswehrkrankenhaus Ulm Abteilung für Innere Medizin Schwerpunkt Gastroenterologie
	03/2006 – 04/2006	Universitätsklinikum Ulm Zentrum für Innere Medizin Schwerpunkt Nephrologie
	09/ 2006 – 10/2006	Kreiskliniken Günzburg- Krumbach Abteilung für Orthopädie
Wahlfächer im Rahmen des Studiums:		EKG – Kurs Nephrologie Praktikum Sonographie

Lebenslauf

Studentische Mitarbeit in der Lehre:	10/2003 – 04/2008	Institut für Pharmakologie und Toxikologie Universität Ulm Problemorientiertes Lernen (POL), Supervisor
Tertiale im praktischen Jahr am Universitätsklinikum Ulm:	02/2007 – 06/2007	Innere Medizin: Nephrologie, Intensivstation
	06/2007 – 10/2007	Chirurgie: Viszeral- und Transplantationschirurgie, chirurgische Endoskopie
	10/2007 – 01/2008	Urologie
Promotion:		„C-reaktives Protein und Atherogenese – Untersuchungen zum PKC- abhängigen Syntheseweg des CRP in Leberzellen“ verfasst in der Abteilung für Innere Medizin II, Universitätsklinikum Ulm