

Universität Ulm

Abteilung Innere Medizin II

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Vinzenz Hombach

**Aktivierung des Liver-X-Rezeptors inhibiert die Expression
von Th1-Zytokinen bei humanen CD4-positiven
Lymphozyten**

Dissertation

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

vorgelegt von

Andreas Kümmel

Hannover

2005

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Nikolaus Marx

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Griesshammer

Tag der Promotion: 27.04.2006

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	9
1.1 Arteriosklerose: Definition und Bedeutung	9
1.2 Pathogenese der Arteriosklerose	10
1.3 Die Rolle von Immunzellen in der Arteriosklerose	12
1.4 Die Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-2	13
1.5 Liver-X-Rezeptoren	13
1.5.1 LXR und Fettstoffwechsel	14
1.5.2 LXR und Arteriosklerose	15
1.6 Zielsetzung und Fragestellungen	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Substanzen und Lösungen	17
2.2 Geräte und Kits	21
2.3 Überblick	23
2.4 Isolierung, Kultur und Stimulation von CD4 ⁺ Zellen	24
2.4.1 Isolierung von CD4 ⁺ -Zellen	24
2.4.2 Messung des Anteils an CD4 ⁺ -Zellen mittels FACS-Messung	27
2.4.3 Stimulation der CD4 ⁺ -Zellen	27

Inhaltsverzeichnis

2.4.4	Zellviabilität	28
2.5	ELISA-Messungen	29
2.6	Northern Blot Analysen	30
2.7	Statistische Analysen	34
3	Ergebnisse	35
3.1	ELISA-Messungen der Th1-Zytokine IFN- γ und TNF- α	35
3.1.1	LXR-Aktivierung inhibiert die Produktion IFN- γ und TNF- α unter CD3-Stimulation	35
3.1.2	LXR-Aktivierung inhibiert die Produktion von Th1-Zytokinen unter PMA/Ionomycin-Stimulation	35
3.2	Messung der mRNA von TNF- α und IFN- γ mittels Northern Blot	39
3.3	Weitere Messungen	41
3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	42
4	Diskussion	43
4.1	Reduktion der mRNA-Menge	43
4.2	Unabhängigkeit vom Stimulus	44
4.3	Streubreiten bei CD3-Stimulation	44
4.4	Untersuchungen zu möglichen Nebeneffekten von T0901317	45
4.4.1	Zellvitalität während der Versuche	45
4.4.2	Ausschluss einer Th2-Antwort	45
4.5	Vermittlung durch den Liver-X-Rezeptor?	46
4.6	IL-2 Ausschüttung	47
4.7	Weitere metabolische Effekte von LXR	47
5	Zusammenfassung	50
	Danksagung	60

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

1	Strukturformeln von LXR-Agonisten	14
2	Magnetabsorption	26
3	T0901317 inhibiert die IFN- γ -Expression bei CD3-Stimulation	36
4	T0901317 inhibiert die TNF- α -Expression bei CD3-Stimulation	36
5	T0901317 hemmt die IFN- γ -Expression bei PMA-Stimulation	37
6	T0901317 hemmt die TNF- α -Expression bei PMA-Stimulation	38
7	T0901317 hemmt die IL2-Expression bei PMA-Stimulation	38
8	Northern Blots	39
9	Hemmung der mRNA-Produktion von TNF- α durch T0901317	40
10	Hemmung der mRNA-Produktion von IFN- γ durch T0901317	40

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABCA1	ATP Binding Cassette Transporter A1
ANOVA	analysis of variance
ApoE	Apo-Lipoprotein E
ApoE ^{-/-}	ApoE Knock Out
ATP	Adenosin-Triphosphat
BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovines serum albumin
c	Konzentration
cDNA	komplementäre DNA
CD	cluster of differentiation
CD4 ⁺	CD4-positiv
Co	Kontrolle
COX	Cyclooxygenase
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DNA	desoxyribonucleic acid

Abkürzungsverzeichnis

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EK	Endkonzentration
ELISA	enzyme linke immuno sorbent assay
FACS	fluorescence activated cell sorting
FAS	Fatty Acid Synthase
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
HBSS	Hank´s buffered salt solution
HDL	high density lipoprotein
HRP	horse radish peroxidase
IFN- γ	Interferon gamma
IL-2	Interleukin-2
LDL	low density lipoprotein
LDLR	LDL-Rezeptor
LDLR ^{-/-}	LDL-Rezeptor Knock Out
LXR	Liver-X-Rezeptor
mRNA	messenger RNA
MACS	magnetic cell sorting
MHC	major histocompatibility complex
MMP	Matrix Metallo-Proteinase
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MW	Mittelwert
n	Fallzahl
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NSB	Northern sample buffer
p	Signifikanzniveau
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction

Abkürzungsverzeichnis

PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
PS	Penicillin/Streptomycin
rpm	rounds per minute
RNA	ribonucleic acid
RT	reverse Transkriptase
RXR	retinoic x receptor
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SDS	sodium dodecyl sulfate
SREBP-1C	Sterol Regulatory Element Binding Protein 1C
SSC	saline sodium citrate
TAE	Tris-acetat-EDTA
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
TWEEN	Polyoxyethylene-sorbitan-monolaurate
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VSMC	Vascular smooth muscle cells

1 EINLEITUNG

1.1 Arteriosklerose: Definition und Bedeutung

Die Arteriosklerose ist ein Sammelbegriff für degenerative Veränderungen in der Arterienwand, welche zur Verhärtung und Verengung der Gefäße führen. Durch die Gefäßverengung kann es zu dauerhafter Mangeldurchblutung kommen, wie z.B. bei der koronaren Herzkrankheit, der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit oder cerebralen Durchblutungsstörungen. Durch plötzliche Einrisse in der Gefäßwand mit Gerinnselbildung können komplette Gefäßverschlüsse auftreten und je nach Lokalisation z.B. Herzinfarkte oder Schlaganfälle bewirken.

Kardiovaskuläre Erkrankungen zählen in Europa und in Nordamerika zu den häufigsten Todesursachen. Aufgrund der zunehmenden Prävalenz in Entwicklungsländern und der Zunahme von Diabetes und Übergewicht in den westlichen Ländern wird erwartet, dass kardiovaskuläre Erkrankungen in den nächsten Jahren die häufigste Todesursache weltweit darstellen werden [38].

Tabelle 1: Risikofaktoren der Arteriosklerose

Faktoren mit genetischer Komponente	Exogene Faktoren
Diabetes mellitus	Nikotinkonsum
Arterielle Hypertonie	Bewegungsmangel
Erhöhte LDL-Spiegel	Ernährung
Niedrige HDL-Spiegel	Krankheitserreger
Erhöhtes Lipoprotein (A)	
Männliches Geschlecht	
Erhöhte Homocystein-Spiegel	
Erhöhte hämostatische Faktoren	
Metabolisches Syndrom	
Übergewicht	
positive Familienanamnese	

1.2 Pathogenese der Arteriosklerose

Der normale Aufbau einer Arterienwand besteht aus drei Schichten: Der Intima, die mit einer einzelligen Endothelschicht das Gefäß von innen auskleidet. Der Media, die neben ringförmig verlaufendem Bindegewebe auch glatte Muskelzellen enthält. Und der Adventitia, die v.a. aus längsverlaufenden Bindegewebsfasern besteht und das Gefäß zur Umgebung hin abgrenzt.

Die Arteriosklerose beginnt mit der Bildung von gelblichen Fettstreifen („fatty streaks“) in der Intima. Diese sind gewöhnlich reversibel. Sie nehmen jedoch an Häufigkeit mit dem Alter zu und lassen sich schon bei Kindern nachweisen. Sie bestehen aus lipidspeichernden Makrophagen, sog. Schaumzellen.

Später bilden sich fibröse Plaques oder Atherome. Das sind beerartige Herde im Bereich der

1 Einleitung

Intima, die durch eine fibröse Kappe aus Kollagen gegen das Gefäßlumen abgegrenzt werden. Im fortgeschrittenen Stadium kann sich im Zentrum ein Lipidkern entwickeln, der aus nekrotischem Gewebe mit Zelltrümmern, Lipiden und Immunzellen besteht (v.a. Makrophagen und T-Zellen). Kleinere Herde, wie sie sich v.a. in Koronararterien finden, enthalten meist nur wenig Fett und bestehen überwiegend aus glatten Muskelzellen und fibrösem Bindegewebe [52, 53].

Die arteriosklerotischen Veränderungen treten vorwiegend an Stellen auf, die stark wechselnden Scherkräften ausgesetzt sind. Das sind v.a. Gefäßabgänge und Gabelungen. Häufigste Lokalisationen sind: Bauchaorta, Koronararterien, die Arteria poplitea und die Arteria carotis interna.

Klinische Erfahrungen und Daten von angiographischen Studien zeigen, dass sich Plaques in Koronararterien nicht kontinuierlich vergrößern, sondern schubweise [5, 62]. Drei unterschiedliche Mechanismen scheinen für den schubweisen Verlauf verantwortlich zu sein:

- Oberflächliche Erosion des Endothels: Sie können durch Freilegung von Kollagenfasern zur Thrombusbildung führen [14].
- Rupturen von Mikrogefäßen: Rupturen innerhalb der Plaque mit Mikrohämmorrhagien können zu einem Wachstum der arteriosklerotischen Läsion führen [4, 27].
- Ruptur der fibrösen Kappe: Durch Freilegung von großer Mengen thrombotischen Materials kommt es auch hier zu einer Thrombusbildung mit plötzlichem Gefäßverschluß. Dies ist der häufigste Mechanismus [14].

Die Hypothesen über die Prozesse der Arteriosklerose haben sich in den letzten Jahrzehnten stark gewandelt. Zunächst führte man die Entstehung von Atheromen auf Verletzungen des Endothels zurück [43, 49]. Später erkannte man zunehmend die Rolle von oxidativ verändertem LDL [39, 42]. In den letzten Jahren rückten vor allem immunologische Phänomene in den Vordergrund. Heute betrachtet man Arteriosklerose als entzündlichen Prozess, an dessen Anfang eine Permeabilitätsstörung der Gefäßwand (sog. endotheliale Dysfunktion) steht.

1.3 Die Rolle von Immunzellen in der Arteriosklerose

In arteriosklerotischen Plaques finden sich auch Immunzellen, darunter Makrophagen, Mastzellen und T-Zellen [23]. Diese gelangen über das Endothel aus dem Blutstrom in die Gefäßwand. Normalerweise widersteht das Endothel einer Anheftung von Leukozyten. Erst wenn es aktiviert ist und Adhäsionsmoleküle präsentiert, können Leukozyten andocken und in die Intima einwandern [41].

Eine Grundlage für die Endothelaktivierung ist u.a. die Infiltration und Retention von LDL in der Intima. Das LDL wird dort oxidativ oder enzymatisch verändert und veranlasst Endothelzellen, Adhäsionsmoleküle, v.a. VCAM-1, zu produzieren [11, 30].

An das aktivierte Endothel können Leukozyten (v.a. Monozyten und Lymphozyten) über VCAM-1 anhaften und an der Gefäßwand entlang rollen. Chemokine, die in der Intima produziert werden, locken sie an die entsprechenden Stellen in der Gefäßwand. Im Gewebe entwickeln sich die Monozyten zu Makrophagen und nehmen über den Scavenger-Rezeptor oxidiertes LDL auf [39]. Das Cholesterin reichert sich in den Zellen in Form kleiner Tröpfchen an, sodass diese später als Schaumzellen in Erscheinung treten.

An der Immunreaktion in arteriosklerotischen Läsionen sind auch T-Zellen beteiligt, wobei die CD4⁺ Zellen (sog. T-Helfer-Zellen) eine entscheidende Rolle spielen [19]. Sie wandern als naive Th0-Zellen aus dem Blut in die Gefäßwand und treffen dort auf Makrophagen, die ihnen Antigene (z.B. oxidiertes LDL) präsentieren. Unter dem Einfluß von Makrophagen-Zytokinen wie Osteopontin entwickeln sie sich zu Th1-Zellen, die wiederum Zytokine, wie IFN- γ , TNF- α und Interleukin-2 ausschütten [21]. Diese Zytokine dirigieren den entzündlichen Prozess in den Atheromen, indem sie Endothelzellen aktivieren, Leukozyten anlocken, die Umwandlung von Monozyten in Makrophagen begünstigen und diese aktivieren.

1.4 Die Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-2

Zytokine sind kleine lösliche Proteine, die von einer Zelle sezerniert werden und das Verhalten oder die Eigenschaften der Zelle selbst oder einer anderen Zelle verändern. Eines der von Lymphozyten freigesetzten Zytokine ist Interferon- γ . In der Arteriosklerose ist seine Wirkung von großer Bedeutung: Es ist das stärkste Makrophagen-aktivierende Zytokin. Außerdem inhibiert es das Wachstum von VSMC und die Kollagenproduktion, was zur Instabilität der Plaque führt [2, 20]. Es trägt auch zur Plaqueruptur bei, indem sie die Produktion von Matrix-Metalloproteinasen steigern, die die extrazelluläre Matrix der fibrösen Kappe zerstören können [44, 45]. Die Bedeutung von IFN- γ wird auch durch Studien gestützt, die zeigen, dass bei Patienten mit Arteriosklerose und akutem Koronarsyndrom erhöhte IFN- γ -Werte im Blut vorliegen [32, 33]. Im Tiermodell konnte bei ApoE^{-/-} Mäusen gezeigt werden, dass eine Unterbrechung des IFN- γ Signalweges zu einer deutlichen Verringerung der arteriosklerotischen Läsionen führt [18, 28]. Umgekehrt führte eine exogene IFN- γ -Zufuhr bei ApoE^{-/-} Mäusen zu einer rapiden Progression der Arteriosklerose [60].

Ein weiteres von T-Zellen freigesetztes Zytokin ist der Tumor Nekrose Faktor α . Er aktiviert das Gefäßendothel, erhöht die Permeabilität der Gefäßwände und aktiviert ebenfalls Makrophagen. Ein anderer wichtiger Botenstoff ist das Interleukin-2, welches die Vermehrung aktivierter T-Zellen bewirkt.

1.5 Liver-X-Rezeptoren

Die Liver-X-Rezeptoren α und β zählen zur Familie der nukleären Rezeptoren, d.h. sie bewirken als Transkriptionsfaktoren eine Änderung der Aktivität ihrer Zielgene, indem sie deren Umschreibung in RNA regulieren.

1.5.1 LXR und Fettstoffwechsel

Liver-X-Rezeptoren wurden zuerst 1995 von Mangelsdorf et al. beschrieben [61]. Sie dienen als physiologische Sensoren für Cholesterinmetabolite im gesamten Körper [22]. Im Einklang damit konnte gezeigt werden, dass ihre endogenen Aktivatoren Metabolite des Cholesterinstoffwechsels sind, wie z.B. 22(R)- und 24(S)-Hydroxycholesterin oder 24(S),25-Epoxycholesterin [15, 29]. Synthetische Aktivatoren sind T0901317 und GW3965. Die beiden Subtypen von LXR (α und β) sind in ihrer Sequenz sehr ähnlich und scheinen von denselben Liganden aktiviert zu werden. Ihre Verteilung im Gewebe unterscheidet sich jedoch: LXR α wird v.a. in Leber, Fettgewebe, und Makrophagen exprimiert. LXR β wird in nahezu allen Organen exprimiert zu werden [47, 58]. LXR besitzen eine DNA-bindende Zinkfinger-Domäne und eine Liganden-bindende Domäne. Die Bindung eines Liganden führt zur Aktivierung des Rezeptors und er bildet zusammen mit dem Retinoid-X-Rezeptor einen heterodimeren Komplex. Dieser bindet an bestimmte DNA-Sequenzen in der Promotorregion der Zielgene, sog. LXR-Response-Elemente, und regelt so deren Expression [61]. Bei dem LXR/RXR-Dimer handelt es sich um permissives Dimer, d.h. es kann durch LXR- oder RXR-Liganden aktiviert werden.

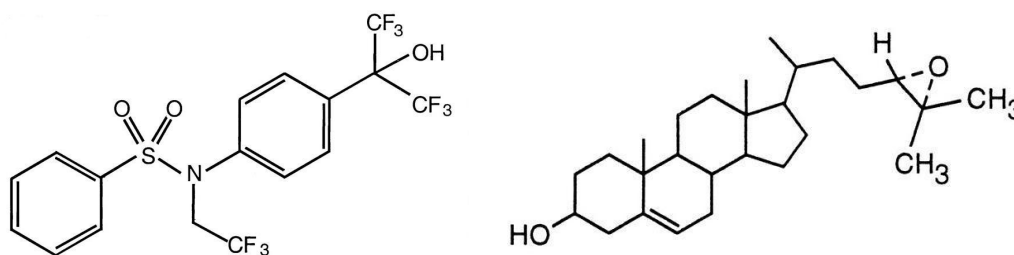


Abbildung 1: Links: Strukturformel von T0901317 nach Schultz et alii [50]. Rechts: Beispiel eines Oxysterols. Gezeigt ist die Strukturformel von 24(S),25-Epoxycholesterin, einem natürlich vorkommenden LXR-Agonisten

Bei Mäusen konnte gezeigt werden, dass LXR-Agonisten die HDL-Konzentration im Plasma erhöhen und die intestinale Cholesterinresorption senken [46, 50]. Umgekehrt sind bei Mäusen, denen das LXR α -Gen fehlt, die LDL-Plasmakonzentrationen stark erhöht und die HDL-Konzentrationen erniedrigt [13]. LXR $\alpha^{-/-}$ Mäuse sind außerdem nicht in der Lage das überschüssige mit der Nahrung aufgenommene Cholesterin in der Leber zu verwerten und auszuscheiden; es reichert sich an, so dass es zu einer starken Leberfunktionsstörung kommt

[40].

LXR β -Knock-Out-Mäuse zeigen diese massive Leberverfettung übrigens nicht. Sie können ihren Cholesterinstoffwechsel auch bei cholesterinreicher Diät noch regulieren. Lediglich die Expression einiger für die Lipogenese zuständiger Gene ist verändert [1].

LXR-Rezeptoren können den Cholesterin-Efflux aus peripheren Zellen über ABC-1 steigern [10]. Sie können auch die Expression von Apolipoprotein E steigern, einem Protein das für den Rücktransport von Cholesterin in die Leber eine wichtige Rolle spielt [35]. Zusätzlich stimulieren sie die Lipogenese über die Aktivierung von SREBP-1c, und fördern damit die Esterbildung von Cholesterin und Fettsäuren. Auf der anderen Seite bewirken sie dadurch leider auch eine Hypertriglyceridämie [48, 63].

1.5.2 LXR und Arteriosklerose

Anhand der von Tierversuchen konnte die Rolle von LXR in der Arteriosklerose genauer untersucht werden. Bei zu Arteriosklerose neigenden ApoE^{-/-} oder LDLR^{-/-} Mäusen führte eine spezifische Ausschaltung von LXR im Knochenmark zu einer signifikanten Beschleunigung der Arteriosklerose [57]. Die Behandlung von ApoE^{-/-} oder LDLR^{-/-}-Mäusen mit LXR-Agonisten führte zu einer Minderung der Plaque-Ausdehnung um 50% [26]. Diese Effekte scheinen einerseits auf den erhöhten Cholesterinefflux aus Makrophagen zurückzuführen sein, andererseits auch auf antiinflammatorische Effekte. Wie kürzlich gezeigt werden konnte, wird durch LXR-Agonisten bei Makrophagen auch die Expression von inflammatorischen Zytokinen beeinflusst. Es zeigt sich u.a. eine verminderte Expression von Mediatoren wie IL-6, COX-2 und MMP-9 [7, 24]. Über die Rolle von LXR in T-Zellen ist bislang noch nichts bekannt.

1.6 Zielsetzung und Fragestellungen

Die in Abschnitt 1.5.2 erwähnten Experimente haben gezeigt, dass LXR-Aktivatoren in der Lage sind, die Produktion von inflammatorischen Zytokinen bei Makrophagen zu supprimieren. In Mausmodellen wurde gezeigt, dass LXR-Agonisten den Verlauf der Arteriosklerose positiv beeinflussen können. Außerdem konnten für andere nukleäre Rezeptoren, wie den Glucocorticoid-Rezeptor, den Retinoid-X-Rezeptor und den Peroxisome-Proliferator-Activated-Receptor, Effekte auf die T-Zell-Aktivität nachgewiesen werden [8, 9, 36].

Da T-Lymphozyten eine entscheidende Rolle in der Koordination der bei der Arteriosklerose ablaufenden Entzündung spielen, stellte sich die Frage, wie und ob LXR-Agonisten sich auf Aktivität von humanen CD4⁺-Zellen auswirken. Hierbei wurden in der vorliegenden Arbeit v.a. die Auswirkungen auf die Produktion der Th1-Zytokine IFN- γ , TNF- α und Interleukin-2 untersucht.

Im Einzelnen ergaben sich die damit verbundenen Fragestellungen:

- Inhibiert LXR-Aktivierung die Produktion von IFN- γ , TNF- α und IL-2?
- Inhibiert LXR-Aktivierung die Produktion der mRNA von IFN- γ , TNF- α und IL-2?
- Sind die Effekte abhängig vom angewandten Stimulus?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Substanzen und Lösungen

Acrylamid	Bio-Rad, USA
Agarose	Life Technologies, Scotland
Agarose-Gel Northern Blot	2,4g Agarose 144ml Aqua
Spüllösung	20ml Running Buffer 10x 36ml Formaldehyd 37%
Anti-Human CD3	Pharmingen, USA
Anti-Human CD4 (FACS)	Immunotech, France
Aqua Spüllösung	Delta-Pharma, Germany
β -Mercaptoethanol	Sigma Diagnostics, USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma Diagnostics, USA
Bromphenolblau	Sigma Diagnostics, USA
Denhardts	Mallinckrodt, Netherlands
DEPC	Sigma Diagnostics, USA
DEPC-H ₂ O	200 μ l DEPC ad 100ml Aqua bidest.
EDTA	Promocell, Germany

2 Material und Methoden

ELISA Blockbuffer	PBS 1% BSA 5% Sucrose 0,05% NaN ₃ Sigma Diagnostics, USA
Essigsäure	Promega Corporation, USA
Ethidiumbromid	BioChrom, Germany
FCS	Roth, Germany
Formaldehyd 37%	Merck, Germany
Formamid	Life Technologies, Scotland
Gentamycin	Sigma Diagnostics, USA
Glycerol	Sigma Diagnostics, USA
Glycin	495ml Aqua bidest 2,5ml SSC 20x 2,5ml SDS 20%
Heißwaschlösung	Braun, Germany
Heparin	Sigma Diagnostics, Germany
H ₂ SO ₄	PAA Laboratories, Austria
Humanes Serum	100ml deionisiertes Formamid 10ml Denhardts 100x 50ml SSC 20x 5ml SDS 20% 33ml Aqua bidest 2ml Salmon Sperm DNA (10mg/ml)
Hybridisierungspuffer	Sigma Diagnostics, USA
Ionomycin	
Kaltwaschlösung	447,5ml Aqua bidest 50ml SSC 20x 2,5ml SDS 20%

2 Material und Methoden

KCl	Sigma Diagnostics, USA
MACS-Puffer	PBS mit 2mM EDTA 10% humanes Serum 0,5% BSA
Master-Mix für Northern Blot	5µl DEPC-H ₂ O 15µl NSB 3,5µl Bromphenolblau
Medium für Lymphozyten	RPMI 1640, Life Technologies, Scotland 10% humanes Serum 1% Penicillin / Streptomycin
MgCl ₂	Sigma Diagnostics, USA
MOPS	Sigma Diagnostics, USA
NaCl	Delta Pharma Germany
NaN ₃	Merck, Germany
Natriumacetat	Mallinckrodt, Netherlands
Natriumcitrat	Mallinckrodt, Netherlands
NSB	200µl deionisiertes Formamid 70µl Formaldehyd 37% 40µl Running Buffer 5x
PBS	Life Technologies, Scotland
PBST	PBS 0,1% Tween 20
Penicillin / Streptomycin	Biochrom, Germany
Percoll	Sigma Diagnostics, USA
PMA	Sigma Diagnostics, USA
Reagent Diluent	Tris Buffered Saline 0,1% BSA 0,05% Tween 20

2 Material und Methoden

Running Buffer 10x für Northern Blot	41,2g MOPS 3,28g Natriumacetat ad 900ml Aqua bidest. 10ml EDTA 0,5M
Salmon Sperm	Amersham pharmacia, UK
SDS	Roth, Germany
Sucrose	Sigma Diagnostics, USA
T0901317	Cayman Chemicals, USA
Tris-buffered Saline	20mM Trizma Base 150mM NaCl
Trizma Base	USB, USA
Tween 20	Sigma Diagnostics, USA

2.2 Geräte und Kits

Blotgerät	Bio-Rad, USA
Brutschrank	Heraeus, Germany
Chromatographiepapier	Whatman International, England
Crosslinker	Fluo-Link FLX, Biometra, Germany
ELISA Development System	DouSet, R&D Systems, USA
ELISA Reader	DPC, USA
ELISA Washer	TECAN, Germany
FACSCalibur Durchflusszytometrie	Becton Dickinson, USA
Filter 30µm	Miltenyi Biotech, USA
Gelkammer Northern Blot	Biometra, Germany
Hybridisierungsöfen	Heraeus, Germany
Hybridisierungsröhrchen	Biometra, Germany
Leucosep-Isolationröhrchen	Greiner Labortechnik, Germany
MACS Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotech, USA
MACS Separation Column LS ⁺	Miltenyi Biotech, USA
Neubauerkammer	Brand, Germany
Nylonmembran Northern Blot	Hybond, Amersham Pharmacia, UK
Photometer	Beckman, USA
Pipetten	Gilson, France
Reaktionsgefäße 1,5ml	Safe Lock, Eppendorf, Germany
Reaktionsgefäße 15ml und 50ml	FALCON, Becton Dickinson, USA
Reaktionsplatten 6, 24 und 96 well	Greiner, Germany
Rediprime Labelling Kit	Amersham Pharmacia, UK
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Germany
Röntgenfilme	Hyperfilm, Amersham Pharmacia, UK
Röntgenkassette	Rego, Germany
Trennsäule	MACS Separation Column LS ⁺

2 Material und Methoden

Vakuumtrockner	SpeedVac, Savant, Germany
Zellkulturschalen 100mm	FALCON, Becton Dickinson, USA
Zellzähler	CASY 1, Schärfe System, Germany
Zentrifuge	Varifuge 3.0R, Heraeus, Germany

2.3 Überblick

Diese Arbeit beruht hauptsächlich auf zwei verschiedenen quantitativen Messmethoden: Der direkten Messung von Zytokinen auf Proteinebene mittels ELISA und der Messung von Zytokin-codierender mRNA mittels Northern Blots. Der grobe zeitliche Ablauf der Versuche ist dabei der folgende:

ELISAs

- Tag 1 Isolierung von CD4⁺-Zellen aus Blut
- Tag 2 Stimulation der Zellen mit CD3-Antikörpern oder PMA/Ionomycin unter Zugabe von T0901317 in der jeweiligen Konzentration
- Tag 4 Ernten der Überstände (Bei PMA/Ionomycin an Tag 2 nach 6 Stunden)
- Tag 5 Durchführung der ELISA-Messung

Northern Blots

- Tag 1 Isolierung von CD4⁺-Zellen aus Blut
- Tag 2 Stimulation der Zellen mit CD3-Antikörpern unter Zugabe von T0901317
Gewinnung der RNA aus den stimulieren Zellen
- Tag 3 Gelelektrophorese der RNA und Kapillarblot
- Tag 4 Hybridisierung, d.h. radioaktive Markierung bestimmter RNA-Sequenzen
- Tag 5 Waschen der Membran und
Röntgenfilmexposition für einige Tage

2.4 Isolierung, Kultur und Stimulation von CD4⁺ Zellen

Für die verschiedenen Versuche wurden humane CD4⁺-Zellen benötigt. Diese wurden je nach Verfügbarkeit aus 150ml venösem Vollblut von freiwilligen Spendern oder aus Buffy-Coat-Präparaten der DRK-Blutspendenzentrale Ulm gewonnen.

Direkt nach der Blutentnahme bzw. Erhalt der Präparate wurde mit der Isolierung der CD4⁺-Zellen begonnen. Nachdem die isolierten Zellen über Nacht im Brutschrank bei 37°C geruht hatten, wurden sie stimuliert. Im Anschluss daran folgten die verschiedenen Messungen (z.B. ELISA, Northern Blots).

2.4.1 Isolierung von CD4⁺-Zellen

Um CD4⁺-Zellen aus Blut zu gewinnen, wurden zunächst die Lymphozyten von den restlichen korpuskulären Blutbestandteilen mittels Zentrifugation getrennt. Nach Zugabe eines eisenmarkierten Antikörpergemisches, das gegen Oberflächenantigene der meisten Zellpopulationen außer CD4⁺-Zellen gerichtet ist, konnte man aus den Lymphozyten die CD4⁺-Zellen durch eine Magnetsäule eluieren.

Isolierung von Lymphozyten aus Vollblut mittels Zentrifugation

Die Isolierung von Lymphozyten aus Vollblut bzw. aus Buffy-Coat-Präparaten erfolgte mittels Dichtegradient-Zentrifugation. Hierzu wurden ein Trennmedium (Histopaque) und Leucosep-Isolation-Röhrchen verwendet. Diese enthalten eine Filterscheibe, auf die 15ml Trennmedium aufgetragen werden. Eine kurze Zentrifugation zieht das Trennmedium unter die Filterscheibe und das Blut (ca. 20ml pro Röhrchen) kann daraufgegeben werden. Nach 15min Zentrifugation bei 700g sammeln sich die Erythrozyten zusammen mit den Thrombozyten am Boden des Röhrchens. Hierauf liegt eine dünne, gräuliche Schicht Granulozyten gefolgt vom Trennmedium. In diesem schwimmt entsprechend der Dichte eine weiße Schicht aus Lymphozyten. Darüber befindet sich das Serum. Das Trennmedium besitzt außerdem die Eigenschaft, eine

Aggregation von Thrombozyten und Erythrozyten zu fördern, was die Sedimentierung zusätzlich begünstigt.

Der Serumüberstand wurde verworfen, die Interphase der mononukleären Zellen auf FALCON-Reaktionsgefäße verteilt und zweimal mit PBS+2mM EDTA gewaschen. Anschließend wurden aus der Zellsuspension mit einem 30µm-Filter größere Partikel entfernt, die eine spätere Auftrennung mittels magnetischer Absorption beeinträchtigen können.

Isolierung von CD4⁺-Zellen aus Lymphozyten mittels Magnetabsorption

Nach Zählung der Zellen wurden alle weiteren Arbeitsschritte in Eiswasser bei 4-8°C durchgeführt, um eine optimale Bindung der Antikörper an die Zellen zu gewährleisten. Der verwendete Antikörpermix, die eisenmarkierten Microbeads-Antikörper, der Magnet und die Trennsäule sind Bestandteile des MACS Cell Isolation Kit. Die notwendigen Mengenverhältnisse von Puffer, Antikörperlösung und Zellzahl sind dort beschrieben.

Die Zellen wurden in MACS-Puffer gelöst, der Antikörpermix hinzugegeben und 10min ruhen gelassen. Dieser Mix enthält unterschiedliche Antikörper, u.a. gegen CD8, CD11b, CD16, CD19, CD36 und CD56, die mononukleäre Zellen aus humanem Blut markieren (Monozyten, NK-Zellen, zytotoxische T-Zellen, B-Zellen, unreife Erythrozyten, Thrombozyten, dendritische oder basophile Zellen). Diese unterschiedlichen Antikörper sind mit Biotin markiert, an das weitere Antikörper binden können, die auf eisenhaltigen Kügelchen (sog. Microbeads) sitzen. Man erhält so ein Konglomerat aus Microbeads und mononukleären Zellen. Es folgt ein weiterer Waschschriff, um freie Antikörper zu entfernen. Dann wird die Zellsuspension auf eine Trennsäule gegeben, die an einem starken Magneten angebracht ist. In der Säule werden die markierten Zellen festgehalten, während die unmarkierten CD4⁺-Zellen als Negativ-Fraktion ausgewaschen werden können. Die erhaltenen CD4⁺-Zellen wurden erneut gezählt, in Zellmedium (RPMI 1640 mit 5% Pencillin/Streptomycin) suspendiert und über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ ruhen gelassen.

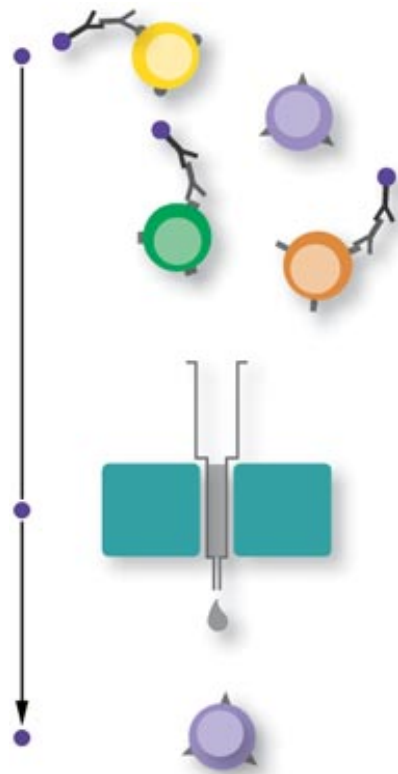


Abbildung 2: Isolation von CD4⁺ Lymphozyten (blau). Das Antikörpermischung bindet an die unterschiedlichen Lymphozyten, anschließend bindet ein eisenmarkierter Antikörper. In der Magnetsäule werden alle markierten Zellen zurückgehalten; die nicht markierten CD4⁺ Zellen werden eluiert.

2.4.2 Messung des Anteils an CD4⁺-Zellen mittels FACS-Messung

Der Anteil der CD4⁺ Zellen an der Negativ-Fraktion wurde mit FACS bestimmt. Dabei wurde eine kleine Probe der isolierten Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 160µl PBS und 5µl Antikörper gegen CD4 30 Minuten lichtgeschützt inkubiert. Der Antikörper ist mit einem fluoreszierenden Molekül (FITC) markiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen in 50 µl Formaldehyd (1%) resuspendiert und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Die Zellen wurden anschließend im FACS-Durchflußzytometer gemessen. Zur Auswertung wurde der jeweilige Anteil CD4⁺ Zellen an der Gesamtzellpopulation herangezogen. Die Stärke der CD4-Expression ergab sich aus der mittleren Stärke der Fluoreszenz.

2.4.3 Stimulation der CD4⁺-Zellen

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet, um die CD4⁺-Zellen zu stimulieren. Zum einem wurde mit PMA/Ionomycin stimuliert. PMA/Ionomycin stellt durch Aktivierung der Proteinkinase C einen sehr starken Reiz für die Zelle dar, und sie produziert daraufhin große Mengen an Zytokinen. Außerdem stellt diese Substanz eine rezeptorunabhängige Stimulation dar. Zum anderen wurde mit CD3-Antikörpern stimuliert, was im Vergleich zu PMA/Ionomycin einer deutlich schwächeren Stimulation entspricht.

CD3-Stimulation

Die Stimulation erfolgte nach Harada et al. durch Aktivierung des CD3-Rezeptors durch einen monoklonalen Antikörper. Dazu wurden Zellkulturplatten (24 well) mit humanem anti-CD3-Antikörper in einer Konzentration von 10µg/ml beschichtet. Eine Negativkontrolle ohne Beschichtung wurde jeweils mitgeführt. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde im Brutschrank hatten sich die Antikörper an die Bodenplatte angeheftet und die Lösung konnte abgesaugt werden. Anschließend wurden die Vertiefungen zweimal mit PBS gewaschen und mit Zellmedium versetzt. Nach erneuter einstündiger Inkubation, wurde in jede Vertiefung 1ml

2 Material und Methoden

Zellsuspension (10^6 Zellen/ml) gefüllt, und je $1\mu\text{l}$ der LXR-aktivierenden Substanz T0901317 in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugegeben. Die Endkonzentrationen in den Vertiefungen betragen: 0,01; 0,1; 1,0 und $10\mu\text{M}$.

Die Versuchsansätze wurden für proteinnachweisende Verfahren (ELISA) 48 Stunden und für mRNA-nachweisende Verfahren (Northern Blot) sechs Stunden inkubiert. Außerdem wurden für Northern-Blots 6-well-Zellkulturplatten mit je 10×10^6 Zellen in 3ml Suspensionslösung pro Vertiefung verwendet, um eine größere Menge an RNA zu erhalten. (Die Konzentration der Agonisten/Stimulanzen wurde beibehalten).

Stimulation mit PMA/Ionomycin

Zunächst wurden $500\mu\text{l}$ Zellsuspension (2 Mio Zellen/ml) zusammen mit jeweils $1\mu\text{l}$ des LXR-Agonisten (in der jeweiligen Konzentration) in die Vertiefungen gegeben. Nach zweistündiger Inkubation im Brutschrank wurden $500\mu\text{l}$ PMA-Ionomycin-Verdünnung in jede Vertiefung gegeben. Diese wurde zuvor aus PMA-Ionomycinlösung hergestellt, die mit Zellmedium 1:500 verdünnt wurde, um eine gleichmäßige Verteilung des PMA-Ionomycin auf alle Reaktionsvertiefungen zu gewährleisten (EK: PMA 10ng/ml , Ionomycin $0,5\mu\text{M}$). Um die Endkonzentration der LXR-Agonisten konstant zu halten, wurden nochmals je $1\mu\text{l}$ der entsprechenden LXR-Lösungen zugegeben (EK 0,01; 0,1 und $1,0\mu\text{M}$)

Diese Versuchsansätze wurden für später stattfindenden ELISAs 6 Stunden inkubiert.

2.4.4 Zellviabilität

Um zu prüfen, ob die später gemessenen Effekte nicht auf einer toxischen Wirkung der LXR-Aktivatoren auf die Zellen beruht, wurde jeweils der Anteil der toten Zellen ausgezählt. Hierzu wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt. Vitale Zellen sind in der Lage, den Farbstoff aktiv aus der Zelle zu transportieren, sodass sich nur tote Zellen blau anfärben.

2.5 ELISA-Messungen

ELISA steht für *enzyme linked immuno sorbent assay*. Mit dieser Methode kann die Konzentration von Proteinen gemessen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Konzentration der Th1-Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-2 im Zellüberstand bestimmt. Für sämtliche durchgeführten ELISAs kam das DuoSet ELISA Development System der Firma R&D Systems zum Einsatz. Die Überstände wurden gewonnen, indem die Zellsuspension nach Stimulation 5min bei 5000U/min zentrifugiert wurde.

Prinzip des ELISA-Verfahrens

Das Prinzip der Methode wird im folgenden kurz erläutert: Mittels des capture-Antikörpers, der gegen eine spezielle Struktur (Epitop) im zu untersuchende Protein gerichtet ist, wird das Protein am Boden der Reaktionsplatte festgehalten. An ein anderes Epitop des festgehaltenen Proteins bindet der detection-Antikörper, welcher mit Streptavidin markiert ist. An das Streptavidin kann ein weiterer Antikörper anhaften, der das Enzym Horseradish-Peroxidase trägt. Dieses Enzym bewirkt eine chemische Reaktion, die quantitativ an der Verfärbung (hier cyan) einer zuvor klaren Flüssigkeit abgelesen werden kann.

Durchführung

Am Vorabend der Versuche wurden die Reaktionsplatten mit 100 μ l/well des capture-Antikörpers versetzt, der gegen das gesuchte Protein gerichtet ist. Dieser heftet sich während der nächtlichen Inkubation am Boden der Platte an. (Die einzusetzenden Konzentrationen richten sich nach dem zu messenden Protein und finden sich in den Anleitungen der Firma R&D) Am nächsten Morgen wurden die Reaktionsplatten mit einem Waschpuffer gespült. Danach wurde jedes Well mit 300 μ l Blockpuffer für eine Stunde beschichtet, um später unspezifische Bindungen von Antikörpern zu verhindern. In der Zwischenzeit wurde eine Verdünnungsreihe (von 0 bis 1000 pg/ml, in 8 Stufen) des zu untersuchenden Proteins in Reagent Diluent angesetzt. Diese Reihe diente später als Standardreferenz für die quantitativen Messungen.

Nachdem der Blockpuffer ausgewaschen worden war, wurden je 100µl Standard bzw. zu bestimmende Proben aufgetragen. Danach wurde die Platte zwei Stunden bei Raumtemperatur ruhen gelassen und dann erneut gewaschen. Dann folgte die Zugabe von 100µl Detection-Antibody, dem ebenfalls zwei Stunden Zeit zur Bindung gelassen wurden. Die ungebundene Antikörper wurden wiederum ausgewaschen und es wurde der enzymmarkierte Antikörper zugegeben, das ganze für weitere zwanzig Minuten ruhen gelassen und anschließend ausgewaschen. Nun erfolgte die Zugabe eines farblosen Gemisches aus 50% H₂O₂ und 50% Tetramethylbenzidin. Das Enzym Horsereddish-Peroxidase wandelt dieses Gemisch in einen stark gefärbten Komplex um. Diese Reaktion wurde nach zwanzig Minuten durch Zugabe einer kleinen Menge Schwefelsäure (2N, 50µl) unterbrochen. Daraufhin konnte die Platte mit einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450nm photometrisch ausgewertet werden.

2.6 Northern Blot Analysen

Northern Blots ermöglichen die quantitative Bestimmung von RNA. In dieser Arbeit wurde die mRNA für IFN- γ , TNF- α und IL-2 gemessen.

Bei einem Northern Blot wird zunächst die RNA ihrer Größe nach durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Danach wird sie aus dem Gel auf eine Membran übertragen („geblottet“). Radioaktiv markierte DNA (sog. Sonde), die die Sequenz eines gewünschten Proteins enthält, kann dann an die gesuchte mRNA binden („Hybridisierung“). Die Membran wird auf einen Röntgenfilm gelegt, der nach einiger Zeit Schwärzungen an den Stellen aufweist, an denen die Sonde gebunden hat.

RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung aus den stimulierten Zellen wurde mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Je 15ml der stimulierten Zellkultur wurden in 50ml Röhrchen (Falcon) und mit eiskalter PBS-

2 Material und Methoden

Lösung bis 50ml aufgefüllt, um eine rasche Temperatursenkung und damit verbundene Stabilisierung der RNA zu bewirken. Danach folgte die Zentrifugation für 5min bei 300g. Der Überstand wurde abgesaugt. Durch Zugabe eines β -Mercaptoethanol-haltigen Lyse-Puffers wurden die T-Zellen „aufgebrochen“ und vorhandene RNAsen inaktiviert. Um das erhaltene Lysat anschließend zu homogenisieren, wurde es durch eine spezielle „Shredder“-Säule zentrifugiert. Der Durchfluß wurde dann auf die „Spin-Column“ gegeben, die eine Silika Gel Matrix enthält, welche RNA adsorbiert. Noch bestehende Verunreinigungen mit DNA oder Proteinen wurden mit Hilfe von unterschiedlichen Waschpuffern herausgelöst. Im letzten Schritt wurde die RNA mit 50 μ l RNase-freiem Wasser eluiert. Das Eluat enthält ein Gemisch sämtlicher RNA-Typen, wovon ungefähr 2% auf die mRNA fallen.

Um die Menge und die Reinheit der erhaltenen RNA zu bestimmen wurde eine kleine Menge des Eluates 1:50 mit DEPC-behandeltem Wasser verdünnt und photometrisch die Extinktion bei 260 und 280nm gemessen. Die Konzentration errechnet sich wie nach:

$$c = E_{260nm} * 40\mu g/ml$$

Die Reinheit kann mit dem Quotienten E_{260nm}/E_{280nm} beurteilt werden. Ein Wert um 2,0 weist auf reine RNA hin.

Gelelektrophorese

Aus den Eluaten wird jeweils ein Volumen entsprechend 5 μ g RNA in Mikroreaktionsgefäße pipettiert und für 30min in einem Vakuumtrockner zentrifugiert, um die restlichen Wassermengen zu entfernen. Die getrockneten Proben wurden in 23,6 μ l Ladepuffer (Mastermix) gelöst. Dieser enthält Methylenblau, welches das Fortschreiten der Elektrophorese sichtbar macht. Die Proben wurden vor für zehn Minuten bei 55°C denaturiert und dann in die Taschen des Gels gebracht. Das verwendete Gel war ein 1,2%iges Agarosegel mit einem Anteil von 18% Formaldehyd und 10% Running Buffer. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von ca. 75 Volt und Raumtemperatur solange durchgeführt, bis die blaue Front des Ladepuffers $3/4$

des Gels durchlaufen hatte. Im Anschluss daran wurde das Gel unter UV-Licht photographiert um zu prüfen, ob eine gleichmäßige Beladung des Gels mit RNA gelang und die RNA nicht zersetzt wurde.

Blotting

Die RNA wurde nun aus dem Gel auf eine Nylonmembran (Hybond) gebracht (sog. Blotting). Dazu wurde die Membran direkt auf die Unterseite des Gels gelegt, über die Membran drei Schichten Chromatographiepapier und darauf mehrere Lagen Zellstoff. Unter dem Gel lagen zwei Schichten Chromatographiepapier, die in Bad aus 10x SSC-Puffer hingen. Die Kapillarwirkung sorgte für einen langsamen Fluß des Puffers aus dem Bad durch das Gel und die Membran in den Zellstoff. Die RNA wurde so über Nacht aus dem Gel auf die Nylonmembran übertragen.

Um die RNA an die Membran zu koppeln, wurden beide Seiten der Membran in einem UV-Crosslinker mit $0,07\text{J}/\text{cm}^2$ für jeweils eine Minute bestrahlt. Die so präparierten Membranen konnten nun mit DNA-Sonden hybridisiert werden.

Hybridisierung und Exposition

Unter Hybridisierung versteht man die Verbindung eines RNA-Stranges mit einem DNA-Strang. Bei einem Northern-Blot ist der DNA-Strang, der auch als Sonde bezeichnet wird, radioaktiv markiert und stellt das passende Gegenstück für die gesuchte mRNA (z.B. für IFN- γ) dar.

Nachdem die Hybridisierungslösung für 30 Minuten bei 42°C denaturiert worden war, wurde die Nylonmembran mit der fixierten RNA in die Lösung gelegt und für 6-8 Stunden bei 42°C langsam rotiert. Diese „Prähybridisierung“ dient dazu, unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzustättigen.

Zur Herstellung der radioaktiv markierten DNA-Sonden, wurde das Rediprime II Labelling Kit verwendet. Es wurden DNA-Sonden hergestellt für IFN- γ , TNF- α , IL-2 und GAPDH.

2 Material und Methoden

Als radioaktive Substanz wurde ^{32}P markiertes α -dCTP verwendet. Zunächst wurden 50 μg DNA-Sonde für das gewünschte Protein in Aqua bidest gelöst und 10 Minuten bei 95°C inkubiert, um ein Auftrennen der DNA-Stränge zu erreichen. Danach wurden die Proben rasch auf Eis abgekühlt, um ein erneutes Aufeinanderlegen der DNA-Stränge zu vermeiden. Die Probe wurde dann in das Reaktionsgefäß des Rediprime Kits pipettiert. Dieses Kit enthält Random Primer, DNA-Polymerase und die Nukleotide dATP, dGTP und dTTP. Das radioaktiv markierte dCTP mußte noch zugegeben werden und die Reaktion konnte durch Erwärmen auf 37°C gestartet werden. Während dieser Zeit wurde ein radioaktiver DNA-Strang synthetisiert. Nach 5min konnte die Reaktion durch Zugabe von 5 μl EDTA gestoppt werden, und die Doppelstränge wurden durch Erhitzen auf 95°C und rasches Abkühlen voneinander getrennt.

Die so gewonnene, radioaktiv markierte Sonde wurde zur Hybridisierung auf die Nylonmembran gegeben und über Nacht bei 42°C inkubiert. Die anschließender Waschung mit Kaltwaschlösung und 60°C warmer Heißwaschlösung für jeweils 15 min entfernt nicht gebundene Sonden. Daraufhin wurde die Membran in Zellophanfolie verpackt und auf einen Röntgenfilm gelegt. Dieser wurde abhängig von der gemessenen Dosisleistung für einige Tage bei -20°C ruhen gelassen.

Um quantitative Aussagen treffen zu können, wurde am Schluss eine Hybridisierung mit GAPDH durchgeführt. GAPDH ist ein konstitutiv exprimiertes Gen, das von allen Zellen in annähernd gleicher Menge produziert wird. Dadurch kann ein Abgleich der zuvor gemessenen Zytokine erreicht werden.

Damit die Membran für mehrere Hybridisierungsvorgänge genutzt werden kann, müssen die gebundenen Sonden entfernt werden (sog. Stripping). Dies gelingt, wenn sie 10 min in siedender 0,1%iger SDS-Lösung behandelt wird und dann kurz in 2%iger SSC-Lösung gewaschen wird.

2.7 Statistische Analysen

Die in dieser Arbeit dargestellten Diagramme zeigen, wenn nicht anders beschriftet, errechnete arithmetische Mittelwerte und die Standardabweichung. Die Daten der mit T0901317 behandelten Ansätzen und der unbehandelten Kontrollen wurden einer Varianzanalyse (hier: one-way-ANOVA) unterzogen und mittels Post-Hoc-Test (hier: Duncan) auf ihre Signifikanz geprüft. Es wurde ein Signifikanzniveau von $p = 0,05$ gewählt. Ein Sternchen in den Diagrammen kennzeichnet jeweils signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrolle.

3 ERGEBNISSE

3.1 ELISA-Messungen der Th1-Zytokine IFN- γ und TNF- α

3.1.1 LXR-Aktivierung inhibiert die Produktion IFN- γ und TNF- α unter CD3-Stimulation

Unstimulierte humane CD4⁺ Zellen sezernieren nur sehr geringe bis gar keine Mengen an IFN- γ , wohingegen die Produktion von IFN- γ nach Stimulation mit CD3-Antikörpern von 2 ± 3 auf 466 ± 544 pg/ml (n=13, MW \pm SD) anstieg. Die Zugabe des LXR-Aktivators T0901317 bewirkte einen konzentrationsabhängigen Rückgang von IFN- γ mit einer maximalen Reduktion auf 40 ± 44 % bei einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ (im Vergleich zur CD3-Aktivierung).

Die Behandlung von CD4⁺ T-Zellen mit T0901317 führte bei TNF- α ebenfalls zu einem konzentrationsabhängigen Rückgang der CD3-induzierten TNF-alpha Produktion auf maximal $51 \pm 33\%$ bei $1 \mu\text{M}$ (n=18). Die ungehemmte Produktion von TNF- α unter CD3-Stimulation betrug 76 ± 65 pg/ml. Die Ergebnisse sind in 4 dargestellt.

3.1.2 LXR-Aktivierung inhibiert die Produktion von Th1-Zytokinen unter PMA/Ionomycin-Stimulation

Um herauszufinden, ob die Effekte des LXR-Aktivators auf die Zytokinproduktion von dem eingesetzten Stimulanz abhängen, wurde auch PMA/Ionomycin zur Stimulation der CD4⁺

3 Ergebnisse

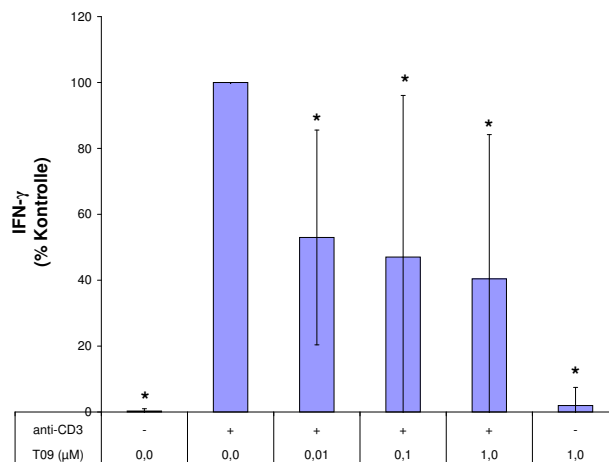


Abbildung 3: Isolierte CD4-positive Zellen wurden in An/Abwesenheit (+/-) von CD3-Antikörpern stimuliert und mit T0901317 in entsprechenden Konzentrationen behandelt. Nach 48 Stunden wurde der IFN- γ -Gehalt im zellfreien Überstand mittels ELISA gemessen. Die Ergebnisse sind als Verhältnis der Konzentrationen von behandelten zu unbehandelten CD3-stimulierten Zellen dargestellt (% Kontrolle). Die Säulen repräsentieren den Mittelwert \pm SD (n=13); * p = 0,05

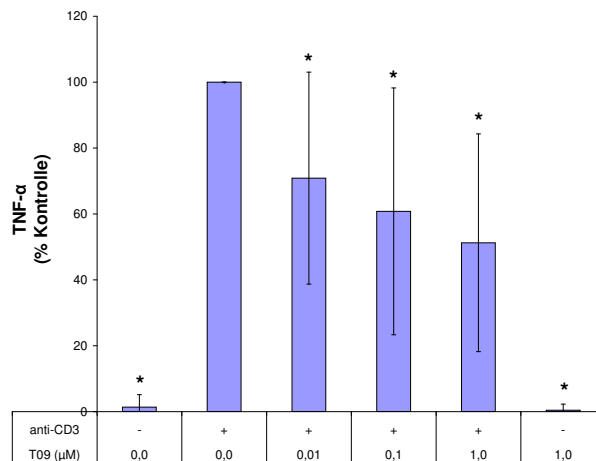


Abbildung 4: TNF- α -Produktion unter Einfluß von T0901317 mit und ohne (+/-) Stimulation durch CD3-Antikörper. Die Ergebnisse sind prozentual auf unbehandelte, CD3-stimulierte Zellen (zweite Säule) bezogen. Die Säulen zeigen MW \pm SD (n=18, *p = 0,05)

3 Ergebnisse

Zellen eingesetzt. PMA/Ionomycin stellt einen starken Reiz zur Produktion von Zytokinen dar, sodass die Stimulationszeit hier bei acht Stunden lag. Die Stimulation mit PMA/Ionomycin bewirkte einen Anstieg der IFN- γ -Konzentration im Überstand von 0 auf 149 ± 55 pg/ml. Unter Behandlung mit dem LXR-Aktivator T0901317 sank diese auf maximal $22\pm 29\%$ bei $0,1\mu\text{M}$ ($n=6$).

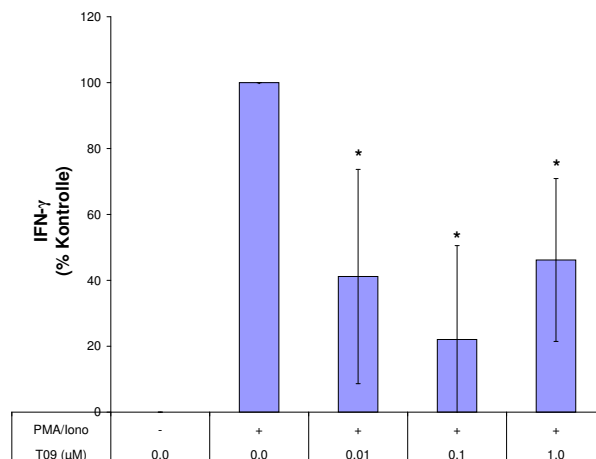


Abbildung 5: IFN- γ -Produktion unter Einfluß von T0901317 mit und ohne (+/-) Stimulation durch PMA/Ionomycin. Die Ergebnisse sind prozentual auf unbehandelte, stimulierte Zellen (zweite Säule) bezogen. Die Säulen zeigen MW \pm SD; $n=6$, * $p = 0,05$.

Die Messungen von TNF- α lieferten ähnliche Ergebnisse: Hier lag die ungehemmte Ausschüttung von TNF- α bei 193 ± 74 pg/ml. Die maximale Hemmung trat bei einer T0901317-Konzentration von $0,1\mu\text{M}$ auf und lag bei $50\pm 12,5\%$ ($n=10$). Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 dargestellt.

Außerdem konnte bei den PMA/Ionomycin-stimulierten Zellen, das Zytokin IL-2 gemessen werden. Auch hier zeigte sich abhängig von der T0901317-Konzentration ein Rückgang der Produktion. Die IL-2 Konzentration im Überstand bei ungehemmter Stimulation lag bei 475 ± 290 pg/ml ($n=10$). Unter Zugabe von T0901317 lag die maximale Reduktion auf $51\pm 16\%$ bei $0,1\mu\text{M}$. (Siehe Abbildung 7.)

3 Ergebnisse

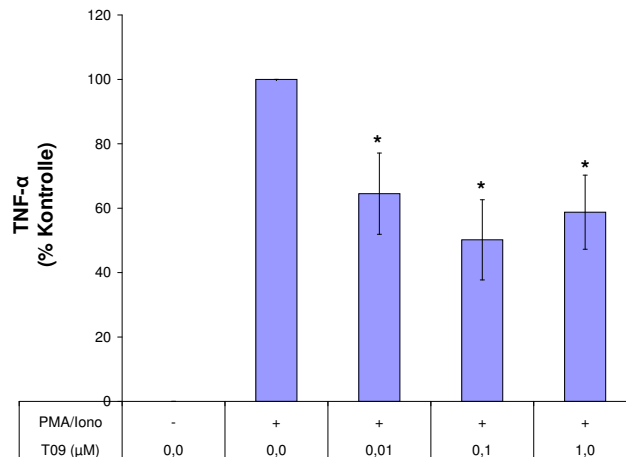


Abbildung 6: TNF- α -Produktion unter Einfluß von T0901317 mit und ohne (+/-) Stimulation durch PMA/Ionomycin. Die Ergebnisse sind prozentual auf unbehandelte, stimulierte Zellen (zweite Säule) bezogen. Die Säulen zeigen MW \pm SD; n=10; * p = 0,05.

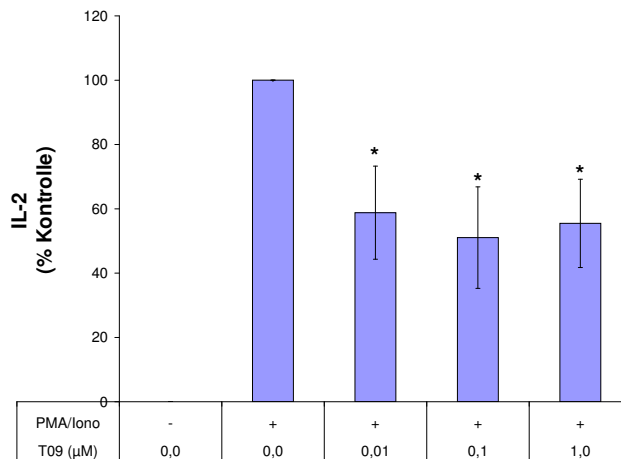


Abbildung 7: Interleukin-2-Produktion unter Einfluß von T0901317 mit und ohne (+/-) Stimulation durch PMA/Ionomycin. Die Ergebnisse sind prozentual auf unbehandelte, stimulierte Zellen (zweite Säule) bezogen. Die Säulen zeigen MW \pm SD; n=10; * p = 0,05.

3.2 Messung der mRNA von TNF- α und IFN- γ mittels Northern Blot

Für die Bestimmung der RNA-Menge wurde der Grad der Schwärzung herangezogen. Um Beladungsschwankungen zu berücksichtigen, wurden die gemessenen Werte auf die Menge des konstitutiv exprimierten Gens GAPDH normalisiert. Die RNA-Menge, die unter alleiniger CD3-Stimulation gemessen wurde, wurde als 100% festgesetzt und die anderen Werte hierauf bezogen.

Die Versuchsbedingungen waren jeweils: unstimulierte Zellen, CD3, CD3 + 1 μ M T0901317, PMA/Ionomycin.

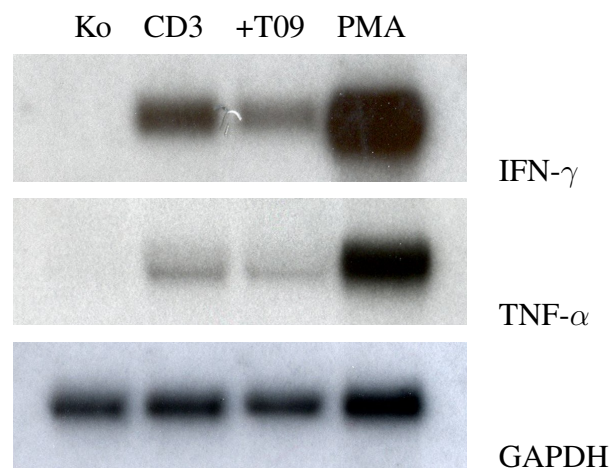


Abbildung 8: Beispiele für Northern Blot Analysen mit unterschiedlichen Sonden. Die Bedingungen waren jeweils unstimulierte Kontrolle, CD3-Stimulation, CD3-Stimulation + 1 μ M T0901317 und PMA/Ionomycin.

Die Zugabe von T09013117 bewirkte einen Rückgang der mRNA-Produktion von TNF- α auf $27 \pm 6,8\%$ (MW \pm SD, n=5) und von IFN- γ auf $35 \pm 28\%$ (MW \pm SD, n=5). Die mitgeführte PMA/Ionomycin-Stimulation diente als positiv-Kontrolle, die relative Zytokinausschüttung lag hier bei $510 \pm 138\%$ für TNF α und bei $1050 \pm 722\%$ für IFN γ . Die Expression von GAPDH blieb bei allen Versuchsbedingungen annähernd dieselbe.

3 Ergebnisse

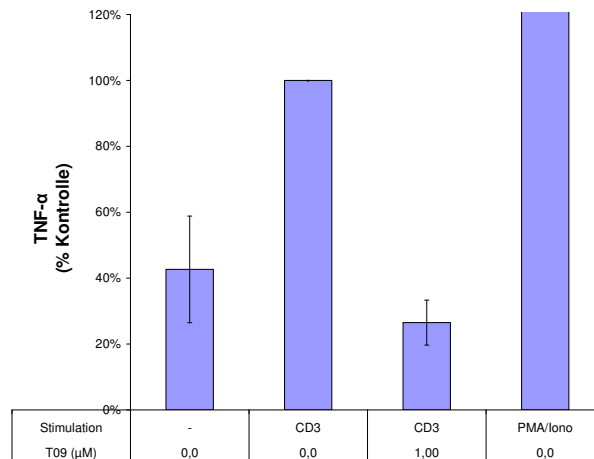


Abbildung 9: Produktion der mRNA von TNF- α unter Einfluß von T0901317 und jeweiligem Stimulanz. Die Ergebnisse sind prozentual auf unbehandelte, CD3-stimulierte Zellen (zweite Säule) bezogen. Die Säulen zeigen MW \pm SD; n=5.

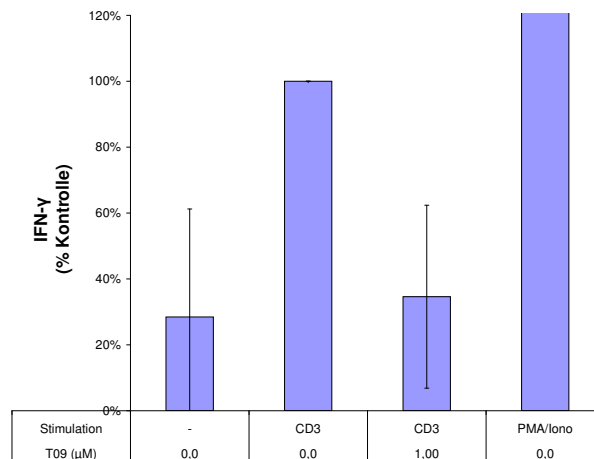


Abbildung 10: Produktion der mRNA von IFN- γ unter Einfluß von T0901317 und jeweiligem Stimulanz. Die Ergebnisse sind prozentual auf unbehandelte, CD3-stimulierte Zellen (zweite Säule) bezogen. Die Säulen zeigen MW \pm SD; n=5.

3.3 Weitere Messungen

Um auszuschließen, dass die Substanz T0901317 eine Umwandlung der Th0-Zellen in Th2-Zellen bewirkt und dadurch der Bildung von Th1-Zytokinen entgegenwirkt, wurde die Ausschüttung von Interleukin-4, einem Th2-Zytokin gemessen. Stimulation mit PMA/Ionomycin induzierte eine Sekretion von 0 auf 12 ± 7 pg/ml, während T0901317 alleine keine Ausschüttung von IL-4 auslöste.

Tabelle 2: IL-4 Ausschüttung (Mittelwerte, n=6)

PMA/Ionomycin	-	-	+	+
T0901317 [μ M]	0	10,0	0	10,0
IL-4 [pg/ml]	0,0	0,0	9,1	9,3

Außerdem wurde die Zellviabilität unter Behandlung mit T0901317 bestimmt. Dies ist ein Maß für die Vitalität der Zelle. Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

Tabelle 3: Zellviabilität (Mittelwerte, n=5)

T0901317 [μ M]	0	1,0	10,0
Vitale Zellen (%)	96,1	96,7	95,1

Zur Messung der Reinheit der Zellen wurden nach Isolation der CD4-positiven-Lymphozyten FACS-Analysen durchgeführt. Diese zeigten, dass mehr als 95% der Zellen CD4⁺ sind.

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Aktivierung von Liver-X-Rezeptoren hemmt die Produktion der Zytokine IFN- γ , TNF- α und Interleukin-2 bei humanen CD4⁺ Zellen. Die gemessenen Zytokinkonzentrationen liegen zwischen $51 \pm 33\%$ ¹ und $22 \pm 29\%$ ² der Kontrollwerte.
2. Aktivierung von Liver-X-Rezeptoren bewirkt einen Rückgang der mRNA von TNF- α und IFN- γ um bis zu zwei Dritteln.
3. Diese Hemmung tritt sowohl bei Stimulation mit CD3-Antikörpern als auch mit PMA-Ionomycin auf.
4. T0901317 bewirkt keine IL-4-Ausschüttung.
5. Die Vitalität der Zellen wird von T0901317 nicht beeinflusst.

¹(MW \pm SD für TNF- α bei CD3-Stimulation)

²(MW \pm SD für IFN- γ bei PMA/Ionomycin-Stimulation)

4 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des LXR-Aktivators T0901317 auf die Zytokinexpression humaner CD4positiver-Lymphozyten untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Aktivierung dieses Rezeptors eine signifikante Reduktion der Expression der proinflammatorischen Zytokine IFN- γ und TNF- α sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene zur Folge hat. Auf Proteinebene konnte eine unter T0901317 eine Reduktion der Zytokinkonzentration je nach Zytokin und Stimulationsmethode auf $51\pm 33\%$ ¹ bis auf $22\pm 29\%$ ² der Kontrollwerte für unbehandelte Zellen beobachtet werden. Die mRNA-Konzentrationen gingen auf ca. ein Drittel der Kontrollwerte zurück (IFN- γ $35\pm 28\%$, TNF- α $27\pm 7\%$).

Dies legt nahe, dass LXR-Aktivatoren einen direkten anti-inflammatorischen Effekt auf CD4-positive T-Zellen haben und zeigt einen neuen Mechanismus für ihren günstigen Einfluß auf die Arterioskleroseentwicklung.

4.1 Reduktion der mRNA-Menge

Der Rückgang der mRNA-Menge von IFN- γ und TNF- α , die in den Northernblots für CD3-Stimulation gezeigt wurde, kann einerseits auf einem beschleunigten Abbau oder auf einer verminderten Produktion der mRNA beruhen. Zytokin-mRNA's tragen häufig in ihrer 3'Region eine Sequenz, die sie instabil macht. Dies soll eine permanente Synthese verhindern und

¹TNF- α bei CD3-Stimulation (MW \pm SD)

²IFN- γ bei PMA/Ionomycin-Stimulation (MW \pm SD)

eine strenge Regulation ermöglichen. Bei Stimulation wird diese mRNA stabilisiert.

In den derzeit veröffentlichten Arbeiten über Liver-X-Rezeptoren und T0901317 gibt es keine Hinweise auf einen beschleunigten Abbau der mRNA. Der Rückgang der mRNA beruht sehr wahrscheinlich auf einer verminderten Transkription. Dies steht im Einklang mit der Wirkungsweise der Liver-X-Rezeptoren, die als nukleäre Rezeptoren direkt die Transkription ihrer Zielgene regulieren.

4.2 Unabhängigkeit vom Stimulus

Die beobachtete Inhibition der Th1-Zytokine bei der Stimulation mit CD3-Antikörpern hätte auch durch eine Verminderung der CD3-Rezeptordichte auf der Zelloberfläche verursacht sein können. Aus diesem Grund wurden die Experimente mit einem Rezeptor-unabhängigen Stimulus durchgeführt. PMA/Ionomycin bewirkt eine direkte T-Zell-Aktivierung über den Ca^{2+} -Signalweg und über die Aktivierung der MAP-Kinase. Die Messungen belegen, dass T0901317 auch bei Umgehung der CD3-Vermittlung eine Verminderung der Zytokinexpression bewirkt (S.37, Abb.5, 6 und 7). Außerdem konnte durch FACS-Messungen direkt gezeigt werden, dass die CD3-Rezeptordichte nicht von T0901317 beeinflusst wird [?].

4.3 Streubreiten bei CD3-Stimulation

Vergleicht man die Standardabweichungen bei den Versuchen mit CD3-Antikörperstimulation mit denen der PMA/Ionomycin-Stimulation, so fällt auf, dass die gemessenen Konzentrationen bei CD3-Stimulation wesentlich stärker schwanken als bei PMA/Ionomycin. Diese Schwankungen sind in der Stimulationsmethode begründet. Bei PMA/Ionomycin wird mit einem löslichen Stimulanz gearbeitet, welches sehr genau dosiert werden kann. Bei CD3-Stimulation werden die Platten mit Antikörpern beschichtet. Dazu werden sie einige Stunden mit einer Lösung inkubiert, die Antikörper enthält und danach gewaschen. Leider schwankt der Anteil der Antikörper, die sich am Boden der Platte anheften, deutlich. Diese Schwan-

kungen bewirken unterschiedliche starke Stimulationen und damit eine größere Streuung der Zytokinkonzentrationen.

4.4 Untersuchungen zu möglichen Nebeneffekten von T0901317

4.4.1 Zellvitalität während der Versuche

Die Reduktion der Zytokinexpression in den gezeigten Experimenten könnte neben LXR-vermittelten Effekten auch durch eine erhöhte Zelltodrate begründet sein. Tote Zellen wären nicht in der Lage, Zytokine zu produzieren und dies könnte zu ähnlich konzentrationsabhängigen Effekten führen. Färbungen mit Trypanblau zeigten jedoch, dass die LXR-Agonisten keine toxischen Wirkungen auf die Zellen haben. Die Vitalität war mit und ohne Behandlung der Zellen gleich hoch (S.41, Tab.3).

4.4.2 Ausschluss einer Th2-Antwort

Die CD4-positiven Zellen befinden sich normalerweise im Ruhezustand und werden als Th0-Zellen bezeichnet. Erst durch Aktivierung (Kontakt mit Antikörpern, Antigen oder PMA/Ionomycin) werden sie je nach vorliegendem Zytokinmilieu zu Th1 oder Th2-Zellen. Th1-Zellen produzieren hauptsächlich Makrophagen-aktivierende Zytokine wie IFN- γ , TNF- α während Th2-Zellen v.a. B-Zell-aktivierendes IL-4 produzieren. Um festzustellen, ob T0901317 eine Verlagerung der Immunantwort im Sinne einer Th2-Antwort bewirkt, wurde die IL-4-Ausschüttung gemessen. Unter Behandlung mit T0901317 wurden keine erhöhten IL4-Konzentrationen gemessen (S.41, Tab.2). Eine Differenzierung der Zellen zu Th2-Zellen scheint demnach unwahrscheinlich.

4.5 Vermittlung durch den Liver-X-Rezeptor?

Es stellt sich bei den beobachteten Effekten von T0901317 die Frage, ob sie überhaupt durch den Liver-X-Rezeptor vermittelt werden oder ob sie noch durch andere Rezeptoren oder Effekte verursacht werden.

In den Veröffentlichungen über Liver-X-Rezeptoren findet man Hinweise auf LXR-unabhängige Effekte. Tontonoz und Joseph verglichen die Wirkung von T0901317 auf murine Wildtyp- und LXR-null-Makrophagen. Der inhibitorische Effekt von T0901317 blieb bei $LXR\alpha^{-/-}$ und $LXR\beta^{-/-}$ Makrophagen erhalten. Erst bei Ausschaltung beider LXR-Subtypen bewirkte die Substanz eine verstärkte Expression von IL-6 und IL-1 β [24]. Im Vordergrund steht also die Wirkung auf den Liver-X-Rezeptor. Weitere Versuche zeigen dass der LXR-Rezeptor auch in der Modulation intrazellulärer Signalwege, wie z.B. cAMP oder murinen G-Protein-Homologa, beteiligt ist [3, 56].

Normalerweise zeigen rezeptorvermittelte Reaktionen eine sigmoide Konzentrationsabhängigkeit. Abweichungen hiervon sprächen für eine Interaktion mit weiteren Rezeptoren oder für andere Reaktionen. In dieser Arbeit konnte bei CD3-Stimulation eine deutlich konzentrationsabhängige Inhibition der Th1-Zytokinexpression beobachtet werden (S.36, Abb.3, 4). Die verwendeten Mengen von T0901317 lagen im selben Bereich, für den andere Arbeitsgruppen die Regulierung von unterschiedlichen LXR-Zielgenen nachgewiesen haben [10, 51, 59].

Die verminderte mRNA-Produktion spricht auch für LXR-vermittelte Effekte, da diese die Transkription der DNA in mRNA regulieren.

Insgesamt betrachtet ist wegen der Konzentrationsabhängigkeit, der mRNA-Reduktion und der Erfahrungen anderer Arbeitsgruppen eine Vermittlung durch den Liver-X-Rezeptor als Ursache für die hier beobachteten Effekte von T0901317 anzunehmen.

4.6 IL-2 Ausschüttung

IL-2 spielt als Zytokin eine wichtige Rolle in der T-Zell-Immunantwort. Bei T-Zellen bewirkt es v.a. Wachstum und Proliferation. In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass IL-2-Produktion bei Stimulation mit PMA/Ionomycin gesenkt wird (S.38, Abb.7). Bei alleiniger Stimulation mit anti-CD3-Antikörpern konnte jedoch keine IL-2-Produktion induziert werden. Dies steht im Einklang mit anderen Beobachtung, wonach für die Synthese und Sekretion von IL-2 ein costimulierendes Signal durch CD28 erforderlich ist[12].

4.7 Weitere metabolische Effekte von LXR

LXR regulieren eine ganze Reihe von Stoffwechselgenen, darunter v.a. die des Cholesterinmetabolismus, der Lipogenese und der Glucogenese aber auch inflammatorische Mediatoren. Welche Auswirkungen diese Mechanismen auf die Entwicklung der Arteriosklerose haben soll hier näher betrachtet werden.

Die physiologische Aufgabe der LXR besteht darin, die Zelle vor einer Überladung mit Cholesterin zu schützen. Sie können den Cholesterinefflux aus der Zelle erhöhen, indem sie das Transportprotein ABCA-1 herstellen. Zusätzlich steigern LXR den HDL-Plasma-Spiegel und sorgen so für einen gesteigerten Rücktransport zur Leber[46, 50]. Durch diese Mechanismen können LXR zur Verringerung der Arteriosklerose beitragen. Auf der anderen Seite steigern sie die Lipogenese, indem sie SREBP1C und FAS induzieren und verursachen bei Mäusen so eine Hypertriglyceridämie[25, 40]. In neueren Untersuchungen an Hamstern und Affen, die ein besseres Modell für den menschlichen Lipidstoffwechsel darstellen, zeigte sich dass die HDL-Plasma-Spiegel unter Behandlung mit LXR-Agonisten nicht erhöht waren, die LDL-Spiegel jedoch anstiegen. Eine Hypertriglyceridämie trat ebenfalls auf [17]. Inwieweit LXR-Agonisten beim Menschen solche unerwünschten Effekt hervorrufen, ist noch nicht untersucht.

Ein weiterer Stoffwechselweg, in den die LXR eingreifen, ist der Glucosestoffwechsel. An

4 Diskussion

Mäusen konnte gezeigt werden, dass LXR-Aktivatoren den Plasma-Glucosespiegel zu senken vermögen[6, 55]. Hierbei werden wichtige Enzyme der Gluconeogenese, wie z.B. Glucose-6-Phosphatase, und u.a. der Glucose-Transporter-4 durch LXR reguliert[54]. Ein bei der Behandlung von Diabetes als Risikofaktor der Arteriosklerose durchaus wünschenswerter Effekt.

LXR greifen bei Mäusen auch in den Renin-Angiotensin-Aldosteron-Mechanismus ein, indem sie die Reninproduktion aktivieren. Damit haben sie auch Auswirkungen auf ein wichtiges Regelsystem des Blutdrucks[37]. Ob dies auch beim Menschen geschieht, ist noch nicht untersucht.

Was die Rolle der LXR bei Entzündungsreaktionen betrifft, so zeichnet sich deutlich ab, dass LXR die Entzündungsmediatoren gegensätzlich zu den Enzymen des Cholesterinstoffwechsels regulieren: sie werden inhibiert. Dies wurde von Joseph und Tontonoz anhand von peritonealen Makrophagen der Maus gezeigt [24]. Der physiologische Zweck scheint darin zu bestehen, beim Verdauen von apoptischen Zellresten und überschüssigem Cholesterin eine unangemessene Entzündungsreaktion zu vermeiden. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, reagieren auch menschliche CD4-positive Zellen mit einer verringerten Ausschüttung von proinflammatorischen Mediatoren. Die CD4-positiven Zellen dirigieren das Zusammenspiel der unterschiedlichen Immunzellen während der Entzündung. Offensichtlich soll auch auf dieser regulatorischen Ebene bei hoher Cholesterinladung der Zelle bzw. der Umgebung eine Entzündungsreaktion vermieden werden. Diese Mechanismen der LXR machen sie zu einem wichtigen Knotenpunkt in der Entstehung der Arteriosklerose. Dies konnte auch in vivo gezeigt werden: So reduzieren LXR-Agonisten das Ausmaß der Arteriosklerose bei LDLR^(-/-) oder ApoE^(-/-) Mäusen[26]. Umgekehrt verursacht die Ausschaltung der LXR-Gene im Knochenmark vermehrt arteriosklerotische Läsionen bei denselben Mausmodellen[57]. Bei arteriosklerotischen Läsionen aktiviert das von T-Zellen produzierte IFN- γ die Gefäßwand und lockt so weitere T-Zellen heran[34]. Außerdem ist IFN- γ in den Rupturprozess der Plaques verwickelt, indem es Makrophagen zur Herstellung von matrixverdauende MMPs anregt, die Kollagensynthese durch VSMC hemmt und so die Stabilität der Plaques gefährdet[16, 31]. Die hier nachgewiesene Reduktion des von den T-Zellen gebildeten IFN- γ kann daher dazu

4 Diskussion

beitragen, die günstigen Effekte der LXR-Aktivatoren auf die Arteriosklerose im Tiermodell zu erklären.

Um das therapeutische Potenzial der LXR-Aktivatoren komplett auszuschöpfen, sind noch weitere Untersuchungen notwendig. Nach dem heutigen Wissensstand müsste man mit unerwünschten Nebeneffekten wie erhöhten Triglyceride, erhöhtem LDL und eventuell erhöhtem Blutdruck rechnen. Auf der anderen Seite wäre aber auch ein günstiger Einfluss auf den Blutzucker zu erwarten. Diese Nebeneffekte könnte man durch Entwicklung von LXR- α bzw. β -selektiven Aktivatoren unter Umständen geschickt umgehen.

Die positiven Effekte auf die Arteriosklerose bei Mäusen, die von Joseph und Tontonoz nachgewiesene antiinflammatorische Wirkung bei Makrophagen und die verminderte Zytokinproduktion bei T-Zellen lassen insgesamt einen potentiell günstigen Netto-Effekt der LXR-Aktivatoren auf den Arterioskleroseverlauf beim Menschen vermuten.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Liver-X-Rezeptoren (LXR) sind nukleäre Rezeptoren, die als Cholesterinsensoren dienen und den Transport von Cholesterin aus der Zelle heraus und zur Leber verstärken. Außerdem inhibieren sie die Produktion inflammatorischer Substanzen bei Makrophagen. Im Tierversuch konnte unter LXR-Aktivierung ein Rückgang arteriosklerotischer Prozesse beobachtet werden.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von T0901317, einem LXR-Aktivator, auf humane CD4⁺-Lymphozyten ¹ untersucht. Dazu wurden die von diesen Zellen produzierten Zytokine Interferon- γ (IFN- γ), Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) und Interleukin-2 (IL-2) gemessen. Die Menge der Zytokine selbst wurde mittels ELISA bestimmt, die relativen Mengen der entsprechenden mRNA mittels Northern-Blot-Analysen.

Für IFN- γ , TNF- α und IL-2 konnte unter Behandlung mit T0901317 ein signifikanter Rückgang auf Proteinebene nachgewiesen werden. Es konnte je nach Zytokin und Stimulationsmethode ein Rückgang der Zytokinkonzentration um mehr als 50 Prozent beobachtet werden. Für IFN- γ und TNF- α konnte eine Reduktion der mRNA-Menge in den Zellen auf ungefähr ein Drittel gezeigt werden.

Diese Arbeit zeigt, dass LXR einen deutlichen inhibitorischen Einfluss auf die Produktion inflammatorischer Zytokine bei CD4⁺-Lymphozyten haben. Die Zytokine dieser Zellen spielen eine Schlüsselrolle bei der Arterioskleroseentstehung. Die LXR-Agonisten können also einen neuen Ansatzpunkt in der Therapie der Arteriosklerose bieten.

¹CD4=cluster of differentiation 4, ein Oberflächenprotein von T-Helfer-Zellen

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] ALBERTI S., SCHUSTER G., PARINI P. FELTKAMP D. DICZFALUSY U. RUDLING M. ANGELIN B. BJORKHEM I. PETTERSSON S. GUSTAFSSON J. A.: *Hepatic cholesterol metabolism and resistance to dietary cholesterol in LXRBeta-deficient mice*. J Clin Invest, 107:565–573, 2001.
- [2] AMENTO E. P., EHSANI N., PALMER H. LIBBY P.: *Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells*. Arterioscler Thromb, 11:1223–1230, 1991.
- [3] ANDERSON L. M., CHOE S. E., YUKHANANOV R. Y. HOPFNER R. L. CHURCH G. M. PRATT R. E. DZAU V. J.: *Identification of a novel set of genes regulated by a unique liver X receptor-alpha -mediated transcription mechanism*. J Biol Chem, 278:15252–15260, 2003.
- [4] BARGER A. C., BEEUWKES R., 3RD: *Rupture of coronary vasa vasorum as a trigger of acute myocardial infarction*. Am J Cardiol, 66:41G–43G, 1990.
- [5] BRUSCHKE A. V., KRAMER J. R., JR. BAL E. T. HAQUE I. U. DETRANO R. C. GOORMASTIC M.: *The dynamics of progression of coronary atherosclerosis studied in 168 medically treated patients who underwent coronary arteriography three times*. Am Heart J, 117:296–305, 1989.

- [6] CAO G., LIANG Y., BRODERICK C. L. OLDHAM B. A. BEYER T. P. SCHMIDT R. J. ZHANG Y. STAYROOK K. R. SUEN C. OTTO K. A.-MILLER A. R. DAI J. FOXWORTHY P. GAO H. RYAN T. P. JIANG X. C. BURRIS T. P. EACHO P. I. ETGEN G. J.: *Antidiabetic action of a liver x receptor agonist mediated by inhibition of hepatic gluconeogenesis*. J Biol Chem, 278:1131–1136, 2003.
- [7] CASTRILLO A., JOSEPH S. B., MARATHE C. MANGELSDORF D. J. TONTONNOZ P.: *Liver X receptor-dependent repression of matrix metalloproteinase-9 expression in macrophages*. J Biol Chem, 278:10443–10449, 2003.
- [8] CIPPITELLI M., YE J., VIGGIANO V. SICA A. GHOSH P. GULINO A. SANTONI A. YOUNG H. A.: *Retinoic acid-induced transcriptional modulation of the human interferon-gamma promoter*. J Biol Chem, 271:26783–26793, 1996.
- [9] CIPPITELLI M., SICA A., VIGGIANO V. YE J. GHOSH P. BIRRER M. J. YOUNG H. A.: *Negative transcriptional regulation of the interferon-gamma promoter by glucocorticoids and dominant negative mutants of c-Jun*. J Biol Chem, 270:12548–12556, 1995.
- [10] COSTET P., LUO Y., WANG N. TALL A. R.: *Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor*. J Biol Chem, 275:28240–28245, 2000.
- [11] CYBULSKY M. I., GIMBRONE M. A., JR.: *Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis*. Science, 251:788–791, 1991.
- [12] DIEHN M., ALIZADEH A. A., RANDO O. J. LIU C. L. STANKUNAS K. BOTSTEIN D. CRABTREE G. R. BROWN P. O.: *Genomic expression programs and the integration of the CD28 costimulatory signal in T cell activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 99:11796–11801, 2002.
- [13] DIETSCHY J. M., TURLEY S. D.: *Control of cholesterol turnover in the mouse*. J Biol Chem, 277:3801–3804, 2002.

- [14] FALK E., SHAH P. K., FUSTER V.: *Coronary plaque disruption*. *Circulation*, 92:657–671, 1995.
- [15] FU X., MENKE J. G., CHEN Y. ZHOU G. MACNAUL K. L. WRIGHT S. D. SPARROW C. P. LUND E. G.: *27-hydroxycholesterol is an endogenous ligand for liver X receptor in cholesterol-loaded cells*. *J Biol Chem*, 276:38378–38387, 2001.
- [16] GENG Y. J., WU Q., MUSZYNSKI M. HANSSON G. K. LIBBY P.: *Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1 beta*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 16:19–27, 1996.
- [17] GROOT P. H., PEARCE N. J., YATES J. W. STOCKER C. SAUERMECH C. DOE C. P. WILLETTE R. N. OLZINSKI A. PETERS T. D'EPAGNIER D. MORASCO K. O. KRAWIEC J. A. WEBB C. L. ARAVINDHAM K. JUCKER B. M. BURGERT M. MA C. MARINO J. P. COLLINS J. L. MACPHEE C. H. THOMPSON S. K. JAYE M.: *Synthetic LXR agonists elevate LDL in CETP species*. *J Lipid Res*, 2005.
- [18] GUPTA S., PABLO A. M., JIANG X. WANG N. TALL A. R. SCHINDLER C.: *IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice*. *J Clin Invest*, 99:2752–2761, 1997.
- [19] HANSSON G. K., JONASSON L., LOJSTHED B. STEMME S. KOCHER O. GABBIANI G.: *Localization of T lymphocytes and macrophages in fibrous and complicated human atherosclerotic plaques*. *Atherosclerosis*, 72:135–141, 1988.
- [20] HANSSON G. K., HELLSTRAND M., RYMO L. RUBBIA L. GABBIANI G.: *Interferon gamma inhibits both proliferation and expression of differentiation-specific alpha-smooth muscle actin in arterial smooth muscle cells*. *J Exp Med*, 170:1595–1608, 1989.
- [21] HANSSON G. K., JONASSON L., SEIFERT P. S. STEMME S.: *Immune mechanisms in atherosclerosis*. *Arteriosclerosis*, 9:567–578, 1989.

Literaturverzeichnis

- [22] JANOWSKI B. A., WILLY P. J., DEVI T. R. FALCK J. R. MANGELSDORF D. J.: *An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha*. *Nature*, 383:728–731, 1996.
- [23] JONASSON L., HOLM J., SKALLI O. BONDJERS G. HANSSON G. K.: *Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque*. *Arteriosclerosis*, 6:131–138, 1986.
- [24] JOSEPH S. B., CASTRILLO A., LAFFITTE B. A. MANGELSDORF D. J. TONTONOZ P.: *Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors*. *Nat Med*, 9:213–219, 2003.
- [25] JOSEPH S. B., LAFFITTE B. A., PATEL P. H. WATSON M. A. MATSUKUMA K. E. WALCZAK R. COLLINS J. L. OSBORNE T. F. TONTONOZ P.: *Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors*. *J Biol Chem*, 277:11019–11025, 2002.
- [26] JOSEPH S. B., MCKILLIGIN E., PEI L. WATSON M. A. COLLINS A. R. LAFFITTE B. A. CHEN M. NOH G. GOODMAN J. HAGGER G. N. TRAN J. TIPPIN T. K. WANG X. LUSIS A. J. HSUEH W. A. LAW R. E. COLLINS J. L. WILLSON T. M. TONTONOZ P.: *Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99:7604–7609, 2002.
- [27] KOCKX M. M., CROMHEEKE K. M., KNAAPEN M. W. BOSMANS J. M. DE MEYER G. R. HERMAN A. G. BULT H.: *Phagocytosis and macrophage activation associated with hemorrhagic microvessels in human atherosclerosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23:440–446, 2003.
- [28] LAURAT E., POIRIER B., TUPIN E. CALIGIURI G. HANSSON G. K. BARIETY J. NICOLETTI A.: *In vivo downregulation of T helper cell 1 immune responses reduces atherogenesis in apolipoprotein E-knockout mice*. *Circulation*, 104:197–202, 2001.
- [29] LEHMANN J. M., KLIEWER S. A., MOORE L. B. SMITH-OLIVER T. A. OLIVER B. B. SU J. L. SUNDSETH S. S. WINEGAR D. A. BLANCHARD D. E. SPENCER T. A.

- WILLSON T. M.: *Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway.* J Biol Chem, 272:3137–3140, 1997.
- [30] LI H., CYBULSKY M. I., GIMBRONE M. A. JR. LIBBY P.: *An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium.* Arterioscler Thromb, 13:197–204, 1993.
- [31] LIBBY P., SUKHOVA G., LEE R. T. GALIS Z. S.: *Cytokines regulate vascular functions related to stability of the atherosclerotic plaque.* J Cardiovasc Pharmacol, 25 Suppl 2:S9–12, 1995.
- [32] LIUZZO G., KOPECKY S. L., FRYE R. L. O’FALLON W. M. MASERI A. GORONZY J. J. WEYAND C. M.: *Perturbation of the T-cell repertoire in patients with unstable angina.* Circulation, 100:2135–2139, 1999.
- [33] LIUZZO G., VALLEJO A. N., KOPECKY S. L. FRYE R. L. HOLMES D. R. GORONZY J. J. WEYAND C. M.: *Molecular fingerprint of interferon-gamma signaling in unstable angina.* Circulation, 103:1509–1514, 2001.
- [34] MACH F., SAUTY A., IAROSSO A. S. SUKHOVA G. K. NEOTE K. LIBBY P. LUSTER A. D.: *Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells.* J Clin Invest, 104:1041–1050, 1999.
- [35] MAK P. A., LAFFITTE B. A., DESRUMAUX C. JOSEPH S. B. CURTISS L. K. MANGELSDORF D. J. TONTONAZ P. EDWARDS P. A.: *Regulated expression of the apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene cluster in murine and human macrophages. A critical role for nuclear liver X receptors alpha and beta.* J Biol Chem, 277:31900–31908, 2002.
- [36] MARX N., KEHRLE B., KOHLHAMMER K. GRUB M. KOENIG W. HOMBACH V. LIBBY P. PLUTZKY J.: *PPAR activators as antiinflammatory mediators in human T lymphocytes: implications for atherosclerosis and transplantation-associated arteriosclerosis.* Circ Res, 90:703–710, 2002.

- [37] MORELLO F., DE BOER R. A., STEFFENSEN K. R. GNECCHI M. CHISHOLM J. W. BOOMSMA F. ANDERSON L. M. LAWN R. M. GUSTAFSSON J. K. LOPEZ-ILASACA M. PRATT R. E. DZAU V. J.: *Liver X receptors alpha and beta regulate renin expression in vivo*. J Clin Invest, 115:1913–1922, 2005.
- [38] MURRAY C. J., LOPEZ A. D.: *Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study*. Lancet, 349:1436–1442, 1997.
- [39] PARTHASARATHY S., FONG L. G., OTERO D. STEINBERG D.: *Recognition of solubilized apoproteins from delipidated, oxidized low density lipoprotein (LDL) by the acetyl-LDL receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 84:537–540, 1987.
- [40] PEET D. J., TURLEY S. D., MA W. JANOWSKI B. A. LOBACCARO J. M. HAMMER R. E. MANGELSDORF D. J.: *Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha*. Cell, 93:693–704, 1998.
- [41] PETER, LIBBY: *Inflammation in atherosclerosis*. Nature, 420:868–874, 2002.
- [42] QUINN M. T., PARTHASARATHY S., FONG L. G. STEINBERG D.: *Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 84:2995–2998, 1987.
- [43] R., ROSS: *Atherosclerosis—an inflammatory disease*. N Engl J Med, 340:115–126, 1999.
- [44] RAJAVASHISTH T. B., LIAO J. K., GALIS Z. S. TRIPATHI S. LAUFS U. TRIPATHI J. CHAI N. N. XU X. P. JOVINGE S. SHAH P. K.-LIBBY P.: *Inflammatory cytokines and oxidized low density lipoproteins increase endothelial cell expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase*. J Biol Chem, 274:11924–11929, 1999.
- [45] RAJAVASHISTH T. B., XU X. P., JOVINGE S. MEISEL S. XU X. O. CHAI N. N. FISHBEN M. C. KAUL S. CERCEK B. SHARIFI B. SHAH P. K.: *Membrane type 1 matrix metalloproteinase expression in human atherosclerotic plaques: evidence for activation by proinflammatory mediators*. Circulation, 99:3103–3109, 1999.

Literaturverzeichnis

- [46] REPA J. J., TURLEY S. D., LOBACCARO J. A. MEDINA J. LI L. LUSTIG K. SHAN B. HEYMAN R. A. DIETSCHY J. M. MANGELSDORF D. J.: *Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers*. Science, 289:1524–1529, 2000.
- [47] REPA J. J., MANGELSDORF D. J.: *The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis*. Annu Rev Cell Dev Biol, 16:459–481, 2000.
- [48] REPA J. J., LIANG G., OU J. BASHMAKOV Y. LOBACCARO J. M. SHIMOMURA I. SHAN B. BROWN M. S. GOLDSTEIN J. L. MANGELSDORF D. J.: *Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRA α and LXRB β* . Genes Dev, 14:2819–2830, 2000.
- [49] ROSS R., GLOMSET J. A.: *Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis*. Science, 180:1332–1339, 1973.
- [50] SCHULTZ J. R., TU H., LUK A. REPA J. J. MEDINA J. C. LI L. SCHWENDNER S. WANG S. THOOLEN M. MANGELSDORF D. J. LUSTIG K. D. SHAN B.: *Role of LXRs in control of lipogenesis*. Genes Dev, 14:2831–2838, 2000.
- [51] SCHWARTZ K., LAWN R. M., WADE D. P.: *ABC1 gene expression and ApoA-I-mediated cholesterol efflux are regulated by LXR*. Biochem Biophys Res Commun, 274:794–802, 2000.
- [52] STARY H. C., CHANDLER A. B., GLAGOV S. GUYTON J. R. INSULL W. JR. ROSENFIELD M. E. SCHAFFER S. A. SCHWARTZ C. J. WAGNER W. D. WISSLER R. W.: *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, 89:2462–2478, 1994.
- [53] STARY HERBERT C., CHANDLER A. BLEAKLEY, DINSMORE ROBERT E. FUSTER VALENTIN GLAGOV SEYMOUR INSULL WILLIAM JR ROSENFIELD MICHAEL E.

- SCHWARTZ COLIN J. WAGNER WILLIAM D. WISSLER ROBERT W.: *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.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 15:1512–1531, 1995.
- [54] STULNIG T. M., STEFFENSEN K. R., GAO H. REIMERS M. DAHLMAN-WRIGHT K. SCHUSTER G. U. GUSTAFSSON J. A.: *Novel roles of liver X receptors exposed by gene expression profiling in liver and adipose tissue.* *Mol Pharmacol*, 62:1299–1305, 2002.
- [55] STULNIG T. M., OPPERMAN U., STEFFENSEN K. R. SCHUSTER G. U. GUSTAFSSON J. A.: *Liver X receptors downregulate 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression and activity.* *Diabetes*, 51:2426–2433, 2002.
- [56] TAMURA K., CHEN Y. E., TANAKA Y. SAKAI M. TSURUMI Y.-KOIDE Y. KIHARA M. PRATT R. E. HORIUCHI M. UMEMURA S. DZAU V. J.: *Nuclear receptor LXRalpha is involved in cAMP-mediated human renin gene expression.* *Mol Cell Endocrinol*, 224:11–20, 2004.
- [57] TANGIRALA R. K., BISCHOFF E. D., JOSEPH S. B. WAGNER B. L. WALCZAK R. LAFFITTE B. A. DAIGE C. L. THOMAS D. HEYMAN R. A. MANGELSDORF D. J. WANG X. LUSIS A. J. TONTONOZ P. SCHULMAN I. G.: *Identification of macrophage liver X receptors as inhibitors of atherosclerosis.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99:11896–11901, 2002.
- [58] TONTONOZ P., MANGELSDORF D. J.: *Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease.* *Mol Endocrinol*, 17:985–993, 2003.
- [59] VENKATESWARAN A., LAFFITTE B. A., JOSEPH S. B. MAK P. A. WILPITZ D. C. EDWARDS P. A. TONTONOZ P.: *Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97:12097–12102, 2000.

Literaturverzeichnis

- [60] WHITMAN S. C., RAVISANKAR P., ELAM H. DAUGHERTY A.: *Exogenous interferon-gamma enhances atherosclerosis in apolipoprotein E-/- mice*. Am J Pathol, 157:1819–1824, 2000.
- [61] WILLY P. J., UMESONO K., ONG E. S. EVANS R. M. HEYMAN R. A. MANGELSDORF D. J.: *LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway*. Genes Dev, 9:1033–1045, 1995.
- [62] YOKOYA K., TAKATSU H., SUZUKI T. HOSOKAWA H. OJIO S. MATSUBARA T. TANAKA T. WATANABE S. MORITA N. NISHIGAKI K. TAKEMURA G. NODA T. MINATOGUCHI S. FUJIWARA H.: *Process of progression of coronary artery lesions from mild or moderate stenosis to moderate or severe stenosis: A study based on four serial coronary arteriograms per year*. Circulation, 100:903–909, 1999.
- [63] YOSHIKAWA T., SHIMANO H., AMEMIYA-KUDO M. YAHAGI N. HASTY A. H. MATSUZAKA T. OKAZAKI H. TAMURA Y. IIZUKA Y. OHASHI K. OSUGA J. HARADA K. GOTODA T. KIMURA S. ISHIBASHI S. YAMADA N.: *Identification of liver X receptor-retinoid X receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein 1c gene promoter*. Mol Cell Biol, 21:2991–3000, 2001.

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Prof. Dr. Vinzenz Hombach für die Ermöglichung dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei Prof. Dr. Nikolaus Marx für die hervorragende Betreuung und stetige Motivation bedanken. Er stand mir mit seinem Wissen nicht nur im Labor, sondern auch in der klinischen Medizin immer hilfsbereit zur Seite.

Bei Renate Durst, Miriam Grüb, Helga Bach und Bettina Kehrlle möchte ich mich sehr herzlich für die praktische und tatkräftige Unterstützung bedanken. Der freundschaftliche und oft fröhliche Umgang in der gesamten Arbeitsgruppe ermöglichte ein sehr angenehmes Arbeiten.

Bei meinen Eltern und Großeltern möchte ich mich ganz besonders für ihre ständige Unterstützung und motivierenden Worte bedanken.