

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN I
PROF. DR. MED. JÜRGEN SCHÖLMERICH
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**EINFLUSS VON REKOMBINANTEM ADIPONEKTIN AUF DIE MONOZYTÄRE
EXPRESSION VON ANNEXIN A6**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Fabian Stögbauer

2009

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN I
PROF. DR. MED. JÜRGEN SCHÖLMERICH
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**EINFLUSS VON REKOMBINANTEM ADIPONEKTIN AUF DIE MONOZYTÄRE
EXPRESSION VON ANNEXIN A6**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Fabian Stögbauer

2009

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Prof. Dr. Bernhard Weber

PD Dr. Christa Büchler

Prof. Dr. Charalampos Aslanidis

17.12.2009

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	v
1 Einleitung	1
1.1 Das Metabolische Syndrom	1
1.2 Besondere Rolle der Adipositas in der Pathogenese des Metabolischen Syndroms	2
1.3 Das menschliche Fettgewebe	3
1.3.1 Bedeutung des Fettgewebes als endokrines Organ	3
1.3.2 Veränderungen im Fettgewebe bei Übergewichtigen	4
1.3.3 Zusammenhang zwischen Übergewicht und der Entstehung von Typ 2 Diabetes mellitus	5
1.4 Zusammenhang zwischen Übergewicht und der Entstehung von Arteriosklerose	7
1.4.1 Physiologie des Lipoprotein-Stoffwechsels	7
1.4.2 Einfluss eines gestörten Fettstoffwechsels auf die Entwicklung der Arteriosklerose	9
1.4.3 Die Rolle der Monozyten in der Pathogenese der Arteriosklerose	9
1.4.4 Funktionell veränderte Blutmonozyten bei Typ 2 Diabetes mellitus und der Arteriosklerose	10
1.5 Das Adipokin Adiponektin	11
1.5.1 Biochemische Charakterisierung von Adiponektin	12
1.5.2 Funktionelle Eigenschaften von Adiponektin	12
1.6 Das Membranprotein Annexin A6	13
1.6.1 Biochemische Charakterisierung	13
1.6.2 Funktionelle Eigenschaften von Annexin A6	14
1.7 Aufgabenstellung	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.1.1 Geräte	16

2.1.2	Verbrauchsmaterialien	17
2.1.3	Chemikalien	18
2.1.4	Antikörper	20
2.1.4.1	Antikörper für Western-Blotting	20
2.1.4.1.1	Primäre Antikörper	20
2.1.4.1.2	Sekundäre Antikörper	20
2.1.4.2	Antikörper für Durchflusszytometrie	20
2.1.5	Kit-Systeme	21
2.1.6	Puffer und Lösungen	21
2.1.6.1	Lösungen für Arbeiten mit Proteinen	21
2.1.6.1.1	Lösungen für die Herstellung von Proteinextrakten	21
2.1.6.1.2	Lösungen für SDS-PAGE	22
2.1.6.1.3	Lösungen für Western-Blotting	23
2.1.6.2	Lösungen für die Isolierung peripherer humaner Monozyten	24
2.1.7	Primer für LightCycler-Analysen	25
2.2	Methoden	26
2.2.1	Isolierung peripherer humaner Monozyten aus Vollblut	26
2.2.2	Herstellung von autologem Serum	27
2.2.3	Stimulierung primärer Monozyten	28
2.2.4	Arbeiten mit cDNA/ RNA	28
2.2.4.1	Isolierung von RNA	28
2.2.4.2	Konzentrationsbestimmung von RNA	29
2.2.4.3	Reverse Transkription	29
2.2.5	Real-Time RT-PCR	30
2.2.6	Arbeiten mit Proteinen	32
2.2.6.1	Präparation von Gesamtzellextrakten	32
2.2.6.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	32
2.2.6.3	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	33
2.2.6.4	Western-Blotting	33
2.2.7	Durchflusszytometrie	35
2.2.8	Statistische Auswertungen	36

3	Ergebnisse	37
3.1	Isolierung peripherer humaner Monozyten aus Vollblut	37
3.1.1	Titration der MACS CD14 Micro Beads	37
3.1.2	Anzahl der isolierten Monozyten in Abhängigkeit von der CD14 Micro Beads Konzentration	37
3.1.3	Anzahl der Monozyten im Durchfluss in Abhängigkeit von der CD14 Micro Beads Konzentration	39
3.1.4	Reinheit der isolierten Monozyten	40
3.1.5	Anzahl an CD14 ⁺ - und CD14 ⁺⁺ -Monozyten	41
3.1.6	Festlegen der optimalen CD14-Beadskonzentration	42
3.2	In vitro Untersuchungen zur Regulation von Annexin A6 in Monozyten	43
3.2.1	Einfluss von rekombinantem Adiponektin auf die Annexin A6-Proteinexpression in peripheren humanen Monozyten	43
3.2.2	Dosisabhängige Veränderung der Annexin A6-Proteinexpression	43
3.2.3	Zeitabhängige Veränderung der Annexin A6-Proteinexpression	44
3.2.4	Rolle der p38 MAP-Kinase in der adiponektinvermittelten Reduzierung von Annexin A6	45
3.2.5	Bedeutung von PPAR α in der adiponektinvermittelten Reduktion von Annexin A6	46
3.2.6	Einfluss von Lovastatin und Methyl- β -Cyclodextrin auf die Proteinexpression von Annexin A6	47
3.2.7	Veränderung der intrazellulären Menge an Annexin A6 durch Metformin	48
3.2.8	Effekt von AICAR auf monozytäres Annexin A6	49
3.2.9	Veränderung der Annexin A6-Proteinexpression durch 9-cis-Retinsäure und 25-Hydroxycholesterin	50
3.2.10	Einfluss von LPS auf monozytäres Annexin A6	51
3.2.11	Effekt von Pioglitazon auf monozytäres Annexin A6	51
3.2.12	Veränderung des monozytären Annexin A6-Gehalts durch die Fettsäuren Palmitinsäure und Ölsäure	52
3.2.13	Auswirkung der Inkubation mit IL-6 und IL-8 auf den intrazellulären Gehalt an Annexin A6	52
3.2.14	Effekt von rekombinantem Adiponektin auf die Annexin A6 mRNA Expression	54

3.3	Annexin A6 in Monozyten von schlanken und übergewichtigen Kontrollen und Typ 2 Diabetikern	55
3.3.1	Annexin A6 in Monozyten von Typ 2 Diabetikern und normalgewichtigen und übergewichtigen Kontrollen	56
3.3.2	Zusammenhang zwischen der Annexin A6 Proteinexpression, dem BMI und dem Adiponektin-Serumspiegel	57
4	Diskussion	59
4.1	Reinigung von Blutmonozyten mit CD14 Micro Beads	59
4.2	Funktionelle Betrachtung des Membranproteins Annexin A6	60
4.2.1	Zusammenfassung wichtiger Annexin A6-Funktionen	60
4.2.2	Mögliche Beteiligung von Annexin A6 an der Entstehung von Arteriosklerose	62
4.3	Zusammenhang zwischen der Adiponektin-Plasmakonzentration, dem BMI und der monozytären Annexin A6-Expression in vivo	62
4.4	Untersuchung des Mechanismus, der zu einer verminderten Expression von Annexin A6 in Monozyten führt	63
4.4.1	Auswirkungen von IL-6, IL-8, freien Fettsäuren und LPS auf Annexin A6 in Monozyten in vitro	63
4.4.2	Einfluss der AMPK auf die Annexin A6-Expression in vitro	64
4.4.3	Effekt von PPAR α auf monozytäres Annexin A6 in vitro	64
4.4.4	Rolle der p38 MAP-Kinase in der Regulation von Annexin A6	64
4.4.5	Auswirkung des Cholesteringehalts auf die Annexin A6-Expression von Monozyten in vitro	65
5	Zusammenfassung	66
6	Publikationen	67
6.1	Erstautorenschaften	67
6.2	Koautorenschaften	67
7	Literaturverzeichnis	68

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
ABCA1	ATP Binding Cassette A-1
ABCG1	ATP Binding Cassette G-1
AdipoR1	Adiponektinrezeptor 1
AdipoR2	Adiponektinrezeptor 2
AICAR	Aminoimidazol-Carboxamid-Ribonukleosid
AK	Antikörper
Anx A6	Annexin A6
AMPK	AMP aktivierte Proteinkinase
AMV-RT	Avian Myoblastosis Virus Reverse Transkriptase
APC	Allophycocyanin
apoA-1	Apolipoprotein A-1
Apo B	Apolipoprotein B
Apo E	Apolipoprotein E
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BCA	Bicinchoninsäure (Bicinchoninic Acid)
BMI	Body mass index
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumine)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (complementary DNA)
CETP	Cholesteryl Ester Transfer Protein
Cp	Crossing Point
CXCL8	Interleukin 8
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid (N=A,T,G,C)
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ER	Endoplasmatisches Reticulum
E _x	Extinktion bei Wellenlänge x
FCS	Fötales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
FFS	freie Fettsäuren
GTP	Guanosintriphosphat
HDL	High Density Lipoprotein
HMG-CoA- Reduktase	Hydroxymethylglutaryl Coenzym A Reduktase
HMW	High Molecular Weight
HRP	Meerrettichperoxidase (Horseradish Peroxidase)
ICAM-1	Intracellular Adhesion Molecule-1
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
Inh	Inhibitor
IRS	Insulinrezeptor Substrat
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LDL	Low Density Lipoprotein
LMW	Low Molecular Weight
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1
MCSF	Monozyten Kolonie-stimulierender Faktor
Metf.	Metformin
MMW	Medium Molecular Weight
mRNA	messenger RNA
NF-κB	Nuklear Factor Kappa B
OA	Ölsäure (Oleic acid)
p38 MAP-Kinase	p38 Mitogen aktivierte Proteinkinase
PA	Palmitinsäure (Palmitic acid)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAI-1	Plasminogen Aktivator Inhibitor-1
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (Phosphate Buffered Saline)

PBST	PBS mit Tween®20
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PG	Pioglitazon
PPAR- α	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha
PPAR- γ	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
SB	p38 MAPK-Inhibitor SB 203580
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TEMED	N, N, N', N', - Tetramethylethylendiamin
TG	Triglyzerid
TLR-4	Toll-like Receptor-4
TNF- α	Tumor Necrosis Faktor alpha
Tris-NH ₃	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan Hydrochlorid
UV	Ultraviolett
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
WHR	Waist-to-hip ratio

1 Einleitung

1.1 Das Metabolische Syndrom

Eine nicht ausgewogene wenig abwechslungsreiche Ernährung und ein Beruf, der oft lange sitzende Tätigkeiten beinhaltet, prägen den Lebensstil vieler Menschen, vor allem in den westlichen Industrienationen. Es kommt hinzu, dass sich viele Betroffene auch in ihrer Freizeit wenig bewegen. Diese Lebensweise kann jedoch keinesfalls als gesund angesehen werden und so nimmt die Prävalenz von Fettleibigkeit, Typ 2 Diabetes mellitus, kardiovaskulären Erkrankungen und anderer assoziierter Stoffwechselstörungen in unserem Kulturkreis stetig zu [1].

Die Tetrade aus Adipositas, verminderter Glukosetoleranz, Hyperlipidämie und Hypertonie wurde von Kaplan als das „Tödliche Quartett“ bezeichnet [2], wobei diese Beschreibung eindrucksvoll auf die zentrale Rolle dieser metabolischen Störungen für die Entstehung schwerer Folgeerkrankungen hinweist.

Ein oft synonym verwendeter Begriff für diesen Symptomenkomplex ist der Ausdruck „Metabolisches Syndrom“, wobei dessen Definition von den unterschiedlichen Fachgesellschaften nicht einheitlich durchgeführt wird. So müssen gemäß der International Diabetes Foundation als Hauptkriterium ein erhöhter Bauchumfang (≥ 94 cm bei Männern bzw. ≥ 80 cm bei Frauen) und zumindest zwei der folgenden Nebenkriterien, gestörte Glukosetoleranz (Nüchternblutzuckerwert > 110 mg/dl), Hypertonie (> 130 mm Hg systolisch bzw. > 85 mm Hg diastolisch) oder erhöhte Triglyzeridwerte (> 150 mg/dl) und erniedrigtes HDL-Cholesterin (< 40 mg/dl bei Männern bzw. < 50 mg/dl bei Frauen), vorliegen [3].

Obwohl die Pathogenese des Metabolischen Syndroms noch nicht eindeutig geklärt werden konnte, zeigen epidemiologische Studien, dass eine Vermehrung des viszeralen Fettanteils als bedeutender Risikofaktor für die Entstehung eines Metabolischen Syndroms anzusehen ist [4].

Die herausragende Bedeutung des Metabolischen Syndroms für den klinischen Alltag besteht darin, dass ein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen eines Metabolischen Syndroms bzw. eines Typ 2 Diabetes mellitus mit mikrovaskulären und makrovaskulären Erkrankungen, wie z. B. kardiovaskulären Erkrankungen, Retinopathien oder Nephropathien, nachgewiesen werden konnte [4, 5].

1.2 Besondere Rolle der Adipositas in der Pathogenese des Metabolischen Syndroms

Adipöse Menschen sind durch ein extremes Übergewicht und durch eine krankhafte Vermehrung ihres Körperfettanteils gekennzeichnet. Zur Diagnose können verschiedene Parameter herangezogen werden, wobei sich die Bestimmung des BMI, des Bauchumfangs und des Taille-Hüft-Verhältnisses etabliert haben. Die Weltgesundheitsorganisation WHO benutzt den BMI, der das Verhältnis von Masse [kg] zur Körpergröße im Quadrat [m²] angibt, um Patienten in die Kategorien untergewichtig, normalgewichtig, übergewichtig und adipös einzuteilen [6] (s. Tabelle 1).

	Body mass index [kg/m²]
Untergewicht	<18,5
Normalgewicht	18,5 – 24,9
Übergewicht	25,0 – 29,9
Adipositas	≥30,0

Tabelle 1: Einteilung von Patienten anhand ihres BMI nach WHO [6].

Betrachtet man hingegen das Verhältnis des Taillenumfangs zum Hüftumfang (waist-to-hip ratio, WHR), so sollte dieses bei Männern <1,0 und bei Frauen <0,85 sein [7]. Adipositas kann als wesentlicher Wegbereiter des Metabolischen Syndroms und damit assoziierter Erkrankungen angesehen werden [4]. So wurde von Guh et al. eine positive Korrelation zwischen dem BMI und dem Auftreten von Typ 2 Diabetes mellitus sowie von kardiovaskulären Gefäßschädigungen nachgewiesen [8]. Neben einer Erhöhung des BMI, die lediglich auf eine Vermehrung des gesamten Körperfettanteils und nicht auf dessen Verteilungsmuster in den verschiedenen Fettdepots hinweist, konnte auch gezeigt werden, dass bei einem erhöhten viszeralen Fettanteil (größere Werte für das Taille-Hüft-Verhältnis) ein größeres Risiko für Typ 2 Diabetes mellitus oder für kardiovaskuläre Erkrankungen vorliegt [4, 9].

1.3 Das menschliche Fettgewebe

1.3.1 Bedeutung des Fettgewebes als endokrines Organ

Um die Rolle des Fettgewebes in der Entstehung von Typ 2 Diabetes mellitus und/oder arteriosklerotischer Gefäßerkrankungen verstehen zu können, muss man sich von der Vorstellung trennen, dass das Fettgewebe lediglich als Speicher für Triglyzeride dient.

Das Fettgewebe besteht neben den Adipozyten aus einem gefäß- und bindegewebsreichen Stroma, welches sich aus Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen und Präadipozyten zusammensetzt [10]. Seine Hauptaufgabe liegt darin, den Körper zu isolieren und zu dämmen sowie, je nach Stoffwechsellage, in der Speicherung und Freisetzung freier Fettsäuren. Der Fettgehalt in den Adipozyten wird dabei hauptsächlich durch das Hormon Insulin reguliert, das seine Wirkung auf adipozytäre Enzyme entfaltet [11].

Neben diesen „klassischen“ Funktionen besitzt das Fettgewebe jedoch auch eine wesentliche Rolle als endokrines Organ. Es sezerniert eine Vielzahl von Hormonen und Zytokinen, die Adipokine, welche u. a. am Glukosestoffwechsel (z. B. Adiponektin, Resistin), am Lipidstoffwechsel (z. B. Cholesteryl Ester Transfer Protein, CETP), an Entzündungsprozessen (z. B. TNF- α , IL-6), an der Blutgerinnung (z. B. Plasminogen Aktivator Inhibitor-1), an der Blutdruckregulation (z. B. Angiotensinogen, Angiotensin II) und am Essverhalten (z. B. Leptin) beteiligt sind [11]. Die Menge an sezernierten Hormonen und Zytokinen korreliert dabei positiv mit der Menge des Fettgewebes und mit der Größe der Adipozyten. Beachtenswert ist hingegen, dass der Adiponektin-Plasmaspiegel mit zunehmendem Körpergewicht abnimmt [11].

Zusätzlich bestehen Unterschiede zwischen viszeralem und subkutanem Fettgewebe bezüglich der Expression verschiedener Gene, z. B. von Angiotensinogen, von Komplementfaktoren und von Leptin [12, 13]. Es wird ferner vermutet, dass hauptsächlich die Zunahme des viszeralen Fettgewebes für die verringerte Menge an Adiponektin im Plasma verantwortlich ist [11].

1.3.2 Veränderungen im Fettgewebe bei Übergewichtigen

Die Stoffwechsellage, die bei massivem Übergewicht vorliegt, kann als eine chronische Entzündung angesehen werden, bei der das Fettgewebe in erhöhtem Maße Arteriosklerose-, Entzündungs- und Insulinresistenz-fördernde Adipokine und verringerte Mengen des protektiven Proteins Adiponektin freisetzt [11]. Dieser Prozess wird hauptsächlich durch Adipozyten und Makrophagen unterhalten [11]. Im Fettgewebe Übergewichtiger ist eine größere Anzahl an Makrophagen vorhanden [10], wobei generell zwischen zwei Makrophagen-Untergruppen unterschieden wird. M1-Makrophagen sezernieren vorwiegend TNF- α und IL-6 und fördern dadurch die Entzündung, M2-Makrophagen bewirken dagegen durch Sekretion von IL-10 Reparationsvorgänge im Gewebe [11]. Die Makrophagen im Fettgewebe nehmen dabei eine Sonderstellung ein. Sie exprimieren typische Oberflächenantigene von M2-Zellen und produzieren vermehrt inflammatorische Zytokine wie M1-Zellen [14, 15].

Bei Überernährung kommt es zu einer Vergrößerung der Adipozyten, wobei diese hypertrophen Adipozyten die Fettsäuren nicht mehr adäquat speichern können [11]. Die Fettsäuren binden an den Toll-like Receptor-4 (TLR-4), welcher von den Makrophagen und Adipozyten exprimiert wird und bewirken dadurch über den Transkriptionsfaktor NF- κ B eine vermehrte Freisetzung von TNF- α [16, 17]. Die Adipozyten werden aktiviert, wodurch diese vermehrt Proteine, u. a. Intracellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1), IL-6 und Macrophage Chemotactic Protein-1 (MCP-1, CCL2) exprimieren [18, 19]. ICAM-1 und MCP-1 führen schließlich zur chemotaktischen Anlockung weiterer Monozyten, die aus dem Blut in das Fettgewebe einwandern, zu Makrophagen differenzieren und somit den Entzündungsprozess unterhalten [11].

Um das vergrößerte Fettgewebe ausreichend mit Sauerstoff versorgen zu können, werden durch geringe Sauerstoffpartialdrücke in den Fettzellen Transkriptionsfaktoren aktiviert, welche eine verstärkte Expression von Angiogenese-fördernden Proteinen, z. B. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Hepatocyte Growth Factor und Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 (PAI-1), bewirken [11]. Dadurch wird jedoch die Aktivität des Adiponektin-Promotors und von PPAR- γ in diesen Zellen gehemmt, was zusammen in einer Verminderung von Adiponektin resultiert [20, 21].

1.3.3 Zusammenhang zwischen Übergewicht und der Entstehung von Typ 2 Diabetes mellitus

Die Adipozyten übergewichtiger Personen sezernieren große Mengen an TNF- α , IL-6 und freien Fettsäuren und bewirken so eine Phosphorylierung von Serinresten am Insulinrezeptor Substrat-1 (IRS1) und am Insulinrezeptor Substrat-2 (IRS2) [22]. Dadurch wird eine Tyrosin-Phosphorylierung der Insulinrezeptor Substrate (IRS) durch den Insulinrezeptor inhibiert und die Weiterleitung des Insulin-Signals verhindert [22]. Es wird darüber hinaus vermutet, dass durch diesen Vorgang die Autophosphorylierung des Insulinrezeptors gehemmt und so die Weiterleitung des Insulin-Signals zusätzlich abgeschwächt wird [11] (Abbildung 1).

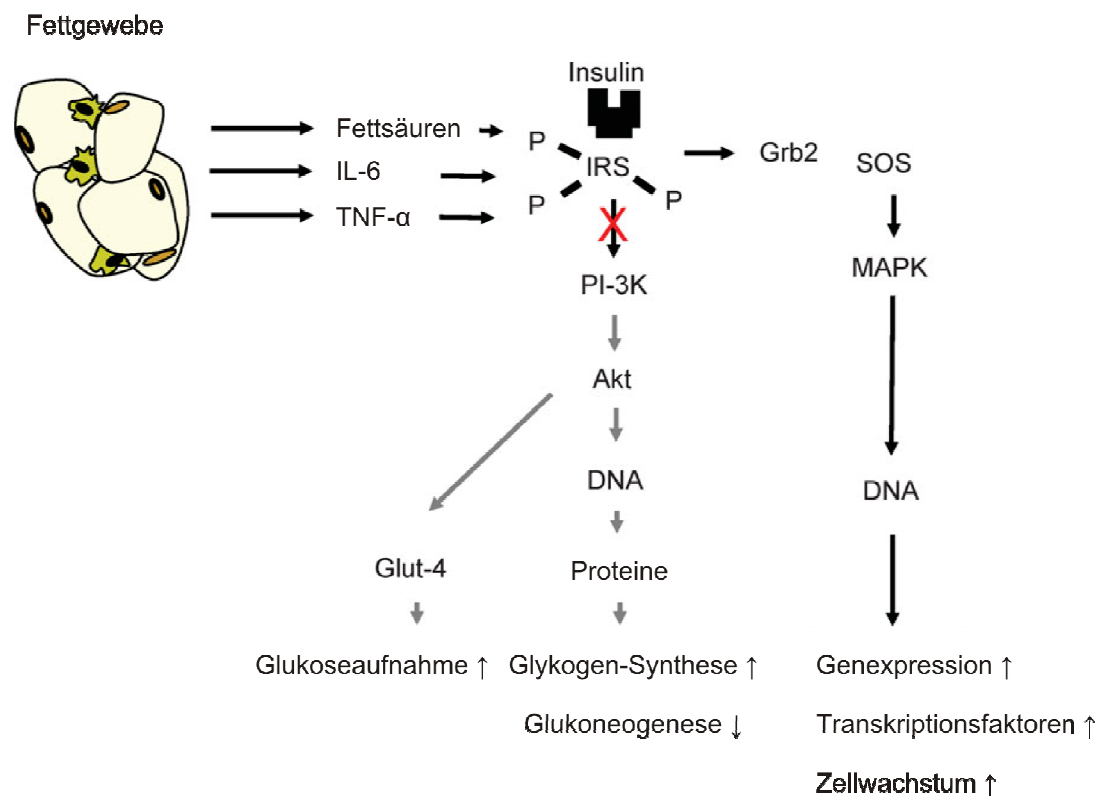


Abbildung 1: Die vermehrte Sekretion von Fettsäuren, IL-6 und TNF- α durch die Adipozyten bewirkt eine Insulin-Resistenz (abgeändert nach [11]).

Zusätzlich führt TNF- α zu einer verminderten Expression von Genen, die für die Insulinwirkung essentiell sind (z. B. PPAR- γ , Glut-4, Insulinrezeptor Substrat-1 und Adiponektin) [19].

Diese Mechanismen tragen somit, zumindest *in vitro*, wesentlich zur Etablierung einer verminderten Insulin-Sensitivität und zunehmender Insulin-Resistenz bei [11]. Ob diese Vorgänge *in vivo* eine ähnlich zentrale Rolle bei der Entstehung eines Typ 2 Diabetes mellitus spielen, erscheint zur Zeit jedoch noch unklar, da der Plasmaspiegel von TNF- α beim Menschen wesentlich geringer ist, als dies für die oben genannten Mechanismen nötig wäre [11].

Neben ansteigender Insulin-Resistenz ist eine Störung der β -Zellen des Pankreas und eine damit verbundene verminderte Insulin-Sekretion aus diesen Zellen als ein wesentlicher Faktor anzusehen, der die Ausbildung eines Typ 2 Diabetes mellitus begünstigt [23]. Welcher Mechanismus für die Dysfunktion der Insulin-sezernierenden Zellen verantwortlich ist, ist noch nicht eindeutig geklärt [23], es soll jedoch im Folgenden die Theorie der „Lipotoxizität“ näher erläutert werden.

Bei Gesunden sezernieren die Adipozyten die Adipokine Leptin und Adiponektin, welche die Insulin-Sekretion vermindern und apoptosehemmend auf die β -Zellen einwirken [24]. Bei zunehmendem Übergewicht nimmt Adiponektin signifikant ab [25]. Obwohl im Gegensatz dazu die Menge an sezerniertem Leptin steigt, liegt jedoch in diesem Stadium wohl eine Leptin-Resistenz in den β -Zellen vor und es kommt unter dem Einfluss von hohen Konzentrationen an freien Fettsäuren, TNF- α und IL-6 zunächst zu einer überschießenden Produktion von Insulin und schließlich zur „Erschöpfung“ sowie zur Apoptose dieser Zellen [24] (Abbildung 2).

Zusammenfassend entwickelt sich ein Typ 2 Diabetes mellitus durch die verminderte Insulin-Sensitivität, welche eine vermehrte Glukoneogenese in der Leber und eine verminderte Glukoseaufnahme in Muskelzellen bewirkt und mit einer geringeren Insulin-Sekretion aus den β -Zellen vergesellschaftet ist [11].

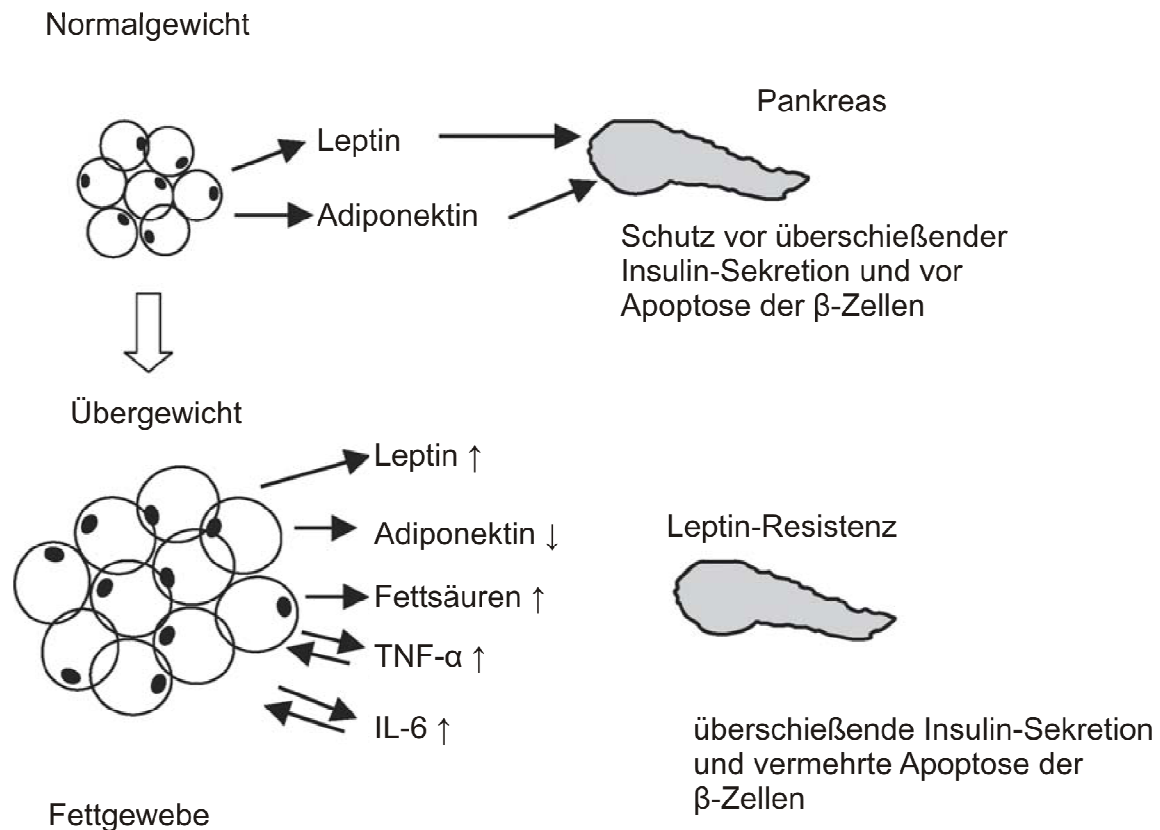


Abbildung 2: Rolle der Adipokine Adiponektin und Leptin für die pankreatischen β -Zellen (abgeändert nach [24]).

1.4 Zusammenhang zwischen Übergewicht und der Entstehung von Arteriosklerose

1.4.1 Physiologie des Lipoprotein-Stoffwechsels

Man unterscheidet mehrere Klassen von Lipoproteinen, die u. a. aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte durch Ultrazentrifugation charakterisiert werden können [26] und die dazu dienen, den Transport wasserunlöslicher Fette in Form von Triglyzeriden und Cholesterin im Blut zu ermöglichen [27]. Die geringste Dichte besitzen die Chylomikronen, gefolgt von den Very Low Density Lipoproteinen (VLDL) und den Low Density Lipoproteinen (LDL). Die höchste Dichte weisen die High Density Lipoproteine (HDL) auf. Die einzelnen Lipoproteinklassen unterscheiden sich anhand ihres Lipidgehalts und ihrer Proteinzusammensetzung, wobei für die verschiedenen Klassen spezielle Apolipoproteine charakteristisch sind [26].

Chylomikronen und VLDL sind besonders triglyzeridreiche Lipoproteine, wobei Chylomikronen für den Transport von mit der Nahrung aufgenommenen Triglyzeriden, VLDL hingegen für den Transport von in der Leber synthetisierten bzw. gespeicherten Triglyzeriden zuständig sind [27]. Von der Leber gelangen die VLDL in extrahepatische Gewebe und geben die Triglyzeride ab, wodurch zunächst Intermediate Density Lipoproteine (IDL) und schließlich LDL entstehen [27].

LDL beinhalten überwiegend das Apolipoprotein B₁₀₀ und befördern Cholesterin bzw. Cholesterinester von der Leber zu den peripheren Geweben, wo es als Membranbaustein oder als Ausgangssubstanz für die Steroidsynthese verwendet wird [27]. Es bindet an den LDL-Rezeptor, der an der Zelloberfläche in peripheren Geweben exprimiert wird und wird anschließend als LDL/LDL-Rezeptor-Komplex endozytiert. In den Lysosomen wird schließlich Cholesterin aus Cholesterinestern abgespalten und in die Zelle freigesetzt [28].

HDL sind hingegen für den reversen Cholesterintransport verantwortlich und transportieren Cholesterin aus den peripheren Geweben zur Leber, wo es über die Galle ausgeschieden wird [27]. Die Zellen können somit verhindern, dass sie mit Cholesterin übersättigt werden, indem sie mittels reversen Cholesterintransports überschüssiges Cholesterin ausschleusen [29]. Hierzu bedienen sie sich membranständiger Transporter, z. B. des ATP Binding Cassette Transporter A-1 (ABCA1) [29]. Dieser Transporter ist notwendig, um HDL-Vorstufen in der Leber zu bilden, aber auch, um Cholesterin aus peripheren Geweben in den HDL-Partikel einzubringen [30]. Die herausragende Rolle, die ABCA1 bei der Entstehung von HDL spielt, zeigt sich bei Patienten mit Mutationen im ABCA1-Gen (Tangier-Krankheit). Es konnte gezeigt werden, dass bei dieser Erkrankung die Menge an HDL im Plasma signifikant erniedrigt ist [31]. Darüber hinaus ist bekannt, dass es eine negative Korrelation zwischen dem HDL-Plasmaspiegel und dem Risiko der Entstehung von Arteriosklerose gibt [30]. Zusätzlich werden HDL antioxidative, antiapoptische, antiinflammatorische und antithrombotische Eigenschaften zugeschrieben [32-34].

1.4.2 Einfluss eines gestörten Fettstoffwechsels auf die Entwicklung der Arteriosklerose

Die Entstehung einer koronaren Herzkrankheit bzw. der Arteriosklerose im Allgemeinen hängt eng mit einer Störung des Fettstoffwechsels zusammen [35].

Charakteristisch dafür sind erhöhte Triglyzerid-Plasmaspiegel [36], eine Vermehrung des Low Density Lipoprotein (LDL) sowie eine Verminderung des High Density Lipoprotein (HDL) [28].

Durch das Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP), das von der Leber gebildet wird, findet ein Austausch von Triglyzeriden und Cholesterinestern zwischen den triglyzeridreichen und cholesterinesterarmen VLDL und den triglyzeridarmen und cholesterinesterreichen HDL statt [37]. Die dadurch entstandenen triglyzeridreichen HDL werden rasch hydrolysiert und über die Niere ausgeschieden, was in einer geringen HDL-Plasmakonzentration resultiert [38].

Bei Übergewichtigen, die hohe Plasmaspiegel an Triglyzeriden aufweisen, ist eine höhere Menge an CETP nachweisbar, was die geringeren Werte für HDL und das erhöhte Risiko für die Entwicklung einer Arteriosklerose erklären würde [39]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Patienten, die kein funktionsfähiges CETP-Gen besitzen, hohe HDL-Plasmakonzentrationen und nur ein geringes Risiko für Gefäßschädigungen aufweisen [38].

1.4.3 Die Rolle der Monozyten in der Pathogenese der Arteriosklerose

Arteriosklerose ist eine chronisch entzündliche Erkrankung zu deren Ätiologie Monozyten und Makrophagen weit reichend beitragen [40] (Abbildung 3).

Zunächst gelangen vermehrt LDL via Diffusion durch die Gefäßwand der peripheren Gefäße und reichern sich im subendothelialen Gewebe an [41]. Die LDL werden enzymatisch verändert und/oder durch reaktive Sauerstoffspezies oxidiert [42]. Die Monozyten wandern ebenfalls in das subendotheliale Gewebe und differenzieren unter dem Einfluss von Zytokinen (z. B. Macrophage Colony-Stimulating Factor, MCSF [43]) und von oxidiertem LDL [44] zu Makrophagen. Die Makrophagen nehmen das oxidierte LDL über Scavenger Rezeptoren auf und wandeln sich zu Schaumzellen um [45]. Sie sezernieren dann ihrerseits Zytokine (Tumor Nekrose

Faktor, Interleukine) und Wachstumsfaktoren und unterhalten so den Entzündungsprozess [40]. Zusätzlich werden glatte Muskelzellen aus der Media angelockt, welche proliferieren, ebenfalls Lipide aufnehmen und schließlich die arteriosklerotische Gefäßumwandlung der Intima fördern [40]).

Eine Hyperlipoproteinämie mit erhöhten Spiegeln an LDL trägt zum Voranschreiten dieses Prozesses bei [46]. Durch den bereits erwähnten reversen Cholesterintransport kann hingegen via HDL in Schaumzellen gespeichertes Cholesterin abtransportiert und die Progression der Erkrankung aufgehalten werden [47].

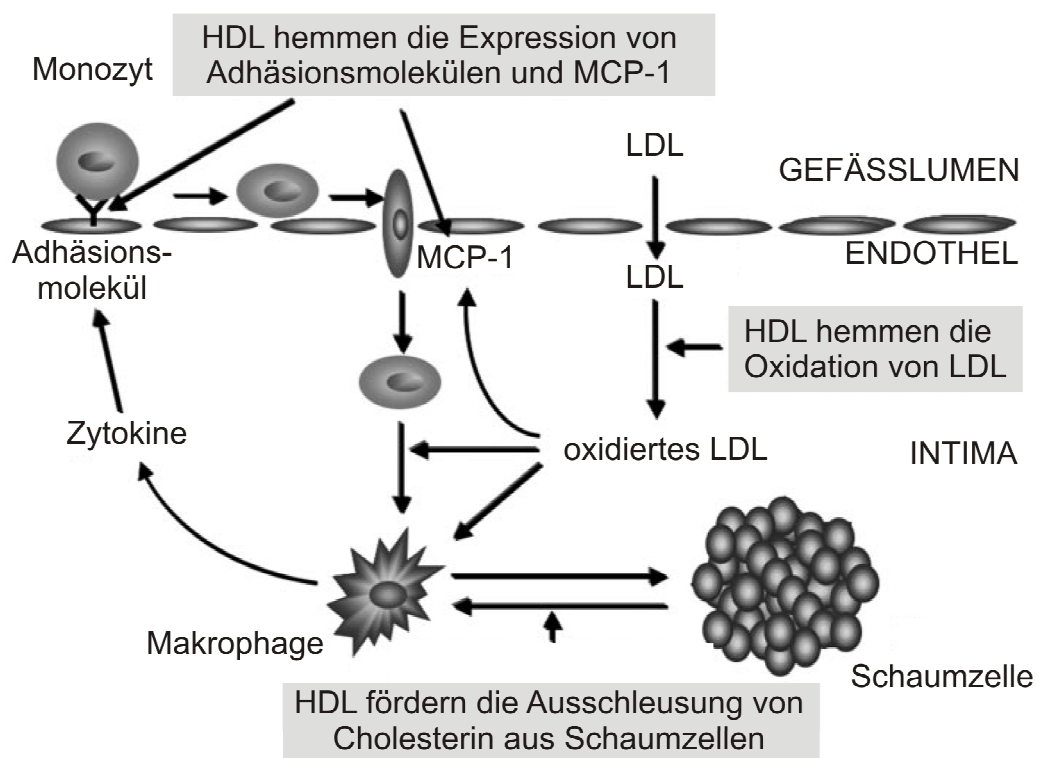


Abbildung 3: Antioxidative und antiinflammatorische Eigenschaften von HDL tragen zum arterioprotektiven Verhalten dieser Lipoproteine bei (abgeändert nach [48]).

1.4.4 Funktionell veränderte Blutmonozyten bei Typ 2 Diabetes mellitus und der Arteriosklerose

Obwohl es viele *in vitro* Studien gibt, die den Einfluss einzelner Faktoren wie erhöhte Glukose, freie Fettsäuren, Leptin, hohes LDL-Cholesterin oder modifiziertes LDL auf

Monozyten untersucht haben [49-51], finden sich relativ wenige *ex vivo* Untersuchungen der primären Blutmonozyten bei Adipositas, Arteriosklerose oder Typ 2 Diabetes mellitus.

Monozyten von Typ 2 Diabetes mellitus Patienten exprimieren signifikant weniger ABCG1, der zusammen mit ABCA1 den wichtigsten Transporter für die Ausschleusung von Cholesterin darstellt. Beachtenswert erscheint die Tatsache, dass die Expression von ABCA1 auf unverändertem Niveau vorlag [52].

Eine Arbeit an männlichen Probanden zeigt, dass die Anzahl zirkulierender Blutmonozyten mit dem BMI korreliert [53]. Die Monozyten weisen des Weiteren eine erhöhte CD11b Expression auf [54]. CD11b wird in aktivierten Zellen induziert und ist für die Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen notwendig. Eine weitere Publikation berichtet über eine erniedrigte Expression des LDL-Rezeptors in Monozyten von Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus, die durch Insulingaben normalisiert werden kann [55]. Der Scavenger Rezeptor CD36, der neben vielen anderen Liganden die Aufnahme von oxidiertem LDL und freien Fettsäuren vermittelt, zeigt eine erhöhte Expression in den Monozyten von Typ 2 Diabetes mellitus Patienten, was durch die Aktivierung des nukleären Hormonrezeptors PPAR γ erklärt werden kann [56]. Weiterhin wurde eine Induktion des Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1) Rezeptors CCR2, von CD45RA und von CD40 in Monozyten von Spendern mit erhöhtem LDL im Serum gefunden [57-59].

1.5 Das Adipokin Adiponektin

Wie bereits erwähnt, ist das Fettgewebe nicht nur als Energiespeicher, sondern vielmehr als endokrines Organ anzusehen, das eine Vielzahl von Proteinen, die Adipokine, sezerniert und welche eine wichtige Rolle für einen ausgeglichenen Stoffwechsel spielen [60]. Besondere Beachtung erlangte dabei neben Leptin das Adipokin Adiponektin, das antiinflammatorische, antidiabetische und arterioprotektive Eigenschaften besitzt, dessen Funktion jedoch noch nicht eindeutig geklärt ist [61].

1.5.1 Biochemische Charakterisierung von Adiponektin

Adiponektin liegt in verschiedenen Isoformen vor, nämlich als trimeres Low Molecular Weight Adiponektin, als hexameres Medium Molecular Weight Adiponektin sowie als High Molecular Weight Adiponektin [62].

Es handelt sich um ein Protein mit vier verschiedenen strukturellen Domänen: Am N-terminalen Ende befindet sich eine Signalpeptidstruktur, es folgt eine kurze hypervariable Region sowie eine Kollagen-Domäne. Am C-Terminus ist schließlich eine Struktur lokalisiert, die eine hohe Ähnlichkeit mit dem Komplementfaktor C1q aufweist [63]. Bis vor einiger Zeit wurde vermutet, dass es ausschließlich von Adipozyten gebildet und sezerniert wird [64]. Neuere Studien deuten jedoch darauf hin, dass Adiponektin darüber hinaus von zahlreichen anderen Zelltypen, wie z. B. Skelettmuskelzellen, in der Leber, der Plazenta und im Knochenmark gebildet wird [61]. Die größte Menge an sezerniertem Adiponektin stammt allerdings aus den Adipozyten [61]. Je nach Studie unterscheiden sich die Werte für die Adiponektin-Plasmakonzentration, wobei der Wert bei gesunden Probanden etwa bei 3 – 30 mg/l liegt [65]. Männer besitzen dabei niedrigere Plasmaspiegel als Frauen [66].

Die Wirkung des Adiponektins wird durch drei verschiedene Rezeptoren vermittelt, wobei der Adiponektinrezeptor 1 (AdipoR1) und der Adiponektinrezeptor 2 (AdipoR2) in allen bisher untersuchten Zellen exprimiert sind [61]. Der dritte Adiponektinrezeptor, T-Cadherin, wird auf Zellen des Gefäßendothels sowie auf glatten Muskelzellen ausgebildet [61]. Das durch Adiponektin an diesen Rezeptoren ausgelöste Signal aktiviert schließlich die AMP aktivierte Proteinkinase (AMPK) in den Zielzellen [67]. Analog konnte durch eine Inaktivierung der AMPK die Wirkung von Adiponektin auf Muskelzellen (Steigerung der Fettsäureoxidation) und auf die Leber (Hemmung der Glukoneogenese) ausgeschaltet werden [68].

1.5.2 Funktionelle Eigenschaften von Adiponektin

Wesentliches Ziel der Adiponektin-Wirkung ist die Leber und die Skelettmuskulatur [67]. Bei Mäusen wurde diesbezüglich unter dem Einfluss von Adiponektin eine Verbesserung im Lipidstoffwechsel und daraus resultierende geringere Triglyzeridwerte im Gewebe sowie eine Erhöhung der Insulin-Sensitivität dargestellt

[69]. Die zweite essentielle Aufgabe von Adiponektin besteht in der Verringerung der Glukoneogenese in der Leber [70].

Daneben spielt Adiponektin eine Rolle in der Ausbildung von schwerwiegenden Stoffwechselerkrankungen. So wurde im Tiermodell gezeigt, dass bei übergewichtigen Rhesusaffen die Adiponektin-Plasmakonzentration abnahm und sich dieser Vorgang schließlich in Insulin-Resistenz und Typ 2 Diabetes mellitus manifestierte [71]. Damit übereinstimmend konnten Lindsay et al. bei einer Studie an Pima Indianern nachweisen, dass hohe Adiponektin-Spiegel protektiv für die Entstehung von Typ 2 Diabetes mellitus sind [72].

Adiponektin schützt überdies vor der Entstehung von Arteriosklerose, indem es die Adhäsion von Monozyten an das Gefäßendothel und die Umwandlung von Monozyten in Schaumzellen verhindert [73-75]. Ein Ansatzpunkt für diesen Mechanismus beschreiben Tsubakio-Yamamoto, indem sie eine stark erhöhte Expression von ABCA1 in Monozyten unter dem Einfluss von Adiponektin nachweisen konnten. Es wird dabei vermutet, dass der dadurch gesteigerte reverse Cholesterintransport und damit die vermehrte Ausschleusung von Cholesterin aus diesen Zellen die arterioprotektiven Eigenschaften vermittelt [76]. Eine Überexpression von Adiponektin in Makrophagen führte dementsprechend zu einer geringeren Lipidansammlung im Zellinneren und zu einem gesteigerten Abtransport von Cholesterin [77].

Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass geringe Adiponektin-Plasmakonzentrationen als unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen angesehen werden können [78].

1.6 Das Membranprotein Annexin A6

1.6.1 Biochemische Charakterisierung

Die Familie der Annexine besteht aus den Annexinen A1 bis A13, wobei allen Mitgliedern gemein ist, dass sie Ca^{2+} -abhängig an Phospholipide binden und auf vielfältige Weise mit der Zellmembran in Interaktion treten können [79].

Das Annexin A6-Gen ist auf Chromosom 5q32 – q34 lokalisiert [80] und codiert ein monomeres 68 kDa schweres Protein und somit das größte Mitglied der Annexin-Familie [81]. Charakteristisch für die Annexine ist eine 70 Aminosäuren umfassende

Domäne, welche im Annexin A6 achtmal, in den restlichen Annexinen nur viermal enthalten ist [81]. Annexin A6 besitzt lediglich eine Ca^{2+} -Bindestelle in der Abwesenheit von Phospholipiden, jedoch acht Ca^{2+} -Bindestellen in Anwesenheit von Phospholipiden [81].

1.6.2 Funktionelle Eigenschaften von Annexin A6

Annexin A6 kann sowohl an der Plasmamembran, an Endosomen, sowie im Zytosol nachgewiesen werden [82], was auf vielfältige Aufgaben dieses Proteins schließen lässt. Seine Lokalisation in der Zelle wird dabei durch die intrazelluläre Ca^{2+} -Verteilung, durch Veränderung des pH-Werts aber auch durch den zellulären Cholesterinstoffwechsel beeinflusst [83]. Es wird vermutet, dass Annexin A6 bei der Verteilung verschiedener Proteine zu bestimmten Zielen innerhalb der Zelle eine wesentliche Rolle spielt [79]. Daneben ist die Expression von Annexin A6 in sekretorisch aktiven Zellen signifikant erhöht, insbesondere, wenn die Sekretion durch den Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration induziert wird [84]. So konnte z. B. nachgewiesen werden, dass Annexin A6 in der Ca^{2+} - bzw. pH-abhängigen Sekretion von Zytokinen durch Lymphozyten eine wesentliche Rolle spielt [85].

Zusätzlich hat dieses Protein eine Vielzahl weiterer Eigenschaften, wie z. B. die Hemmung der Phospholipase A_2 , sowie der Blutgerinnung und die Steuerung von Calciumkanälen im Sarkoplasmatischen Retikulum [81].

Darüber hinaus wird vor allem eine Beteiligung von Annexin A6 an der rezeptorvermittelten Endozytose sowie an der Exozytose erwogen [86].

1.7 Aufgabenstellung

Blutmonozyten von Patienten mit einem erhöhten Risiko für arteriosklerotische Erkrankungen zeigen veränderte Eigenschaften, die unter anderem die vermehrte Einlagerung von Lipiden begünstigen. Monozyten exprimieren Annexin A6, das eine wichtige Funktion im reversen Cholesterintransport besitzt. In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob sich die Annexin A6 Expression der Monozyten von Typ 2 Diabetikern von der übergewichtiger bzw. normalgewichtiger Kontrollen unterscheidet. Darüber hinaus sollte der Einfluss des Adipokins Adiponektin, welches bei Typ 2 Diabetikern in geringeren Mengen sezerniert wird, auf das monozytäre Annexin A6 untersucht werden. Es sollte des Weiteren geklärt werden, ob Mediatoren mit einer Rolle in der Pathogenese von Typ 2 Diabetes mellitus, wie Fettsäuren oder Zytokine, die Annexin A6-Proteinemenge in Monozyten verändern. Überdies wurde untersucht, ob Medikamente, die zur Behandlung dieser Patienten häufig verwendet werden, Annexin A6 beeinflussen. Diese Versuche sollten klären, ob Annexin A6 möglicherweise eine Rolle bei diesen metabolischen Erkrankungen spielt.

Da viele verschiedene Versuchsansätze geplant waren, sollte zunächst eine einfache Methode zur Isolierung der Monozyten etabliert werden, die reproduzierbar und kostengünstig ist, dabei aber eine hohe Reinheit erzielt. Darüber hinaus ist es von Bedeutung, dass durch die gewählte Technik die Monozyten nicht aktiviert werden, was zu einer Verfälschung der Messergebnisse führen könnte. Den besten Kompromiss bezüglich dieser genannten Anforderungen stellt die Isolation via CD14 Micro Beads dar, die an das Oberflächenantigen CD14 auf der Monozytenoberfläche binden und die Separation von Monozyten von den restlichen Blutzellen durch Anlegen eines Magnetfeldes erlauben. In einem ersten Versuchsansatz sollte deshalb zunächst die Menge an CD14 Micro Beads ermittelt werden, die einerseits notwendig ist, um eine hohe Anzahl reiner Monozyten zu isolieren und die andererseits die entstehenden Kosten so gering wie möglich hält.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Analysenwaage BP 221 S	Sartorius
Analysenwaage PT-1200	Sartorius
Autoklav Varioklav Dampfsterilisator	H + P
Automixer II Plus	Kodak
Blockthermostat BT 100	Kleinfeld Labortechnik
Drehschieber Vakuumpumpe RZ 2	Vacubrand
ELISA-Reader	Molecular Devices
Entwickler M35 X-Omat Prozessor	Kodak
Erdgasbrenner	Bochem
FACScalibur	Becton Dickinson (BD)
Flüssigstickstoffanlage·ESPACE·600	AIR LIQUIDE Karyotechnik
Inkubationsschrank 37°C, 5% CO ₂	Heraeus Instruments
LC Carousel Centrifuge	Roche
LightCycler® Real-Time RT-PCR mit Zubehör	Roche
MACS MultiStand QuadroMACS	Miltenyi Biotec
Magnetrührer MR 3000 D	Heidolph
Magnetrührer/Heizplatte MR 3001 K	Heidolph
Mikroskop und Zubehör	Nikon
Milli-Q Biocell	Millipore
NanoDrop	Peqlab
pH-Meter 764 Multi-Calimatic	Knick
Pipettensatz	Eppendorf
Power Supply E445	Consort
Power Supply E835	Consort
Power Supply Power Pac 200	BIORAD
Schüttler 3013	GFL
Schüttler HS 501 digital	IKA Labortechnik
Schüttler Typ VX 2E	Janke und Kunkel

SDS-Gelapparatur Minigel und Zubehör	BIORAD
SDS-Gelplatten und Zubehör	BIORAD
Sicherheitswerkbank	Heraeus Instruments
Sterilisator WTC	Binder
Thermoblock TB 1	Biometra
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf
Tischzentrifuge 5424	Eppendorf
Tischzentrifuge Biofuge Pico	Heraeus Instruments
Ultraschallgerät mit Power Supply	Bandelin
Vakuumpumpe	KNF Laboport
Vortex VF2	Janke und Kunkel
Wasserbad WPE 45	Memmert
X-Ray Filmkassette (18 x 24 cm)	Siemens
Zellzählkammer, Tiefe 0,100 mm	Neubauer
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Absaugpipette (5 ml)	BD Falcon
ELISA-Platte (96 Loch)	Corning Costar®
Gel Blotting Papier Whatman	Schleicher & Schuell BioScience
Hyperfilm ECL™	Amersham Biosciences
Immun-Blot™ PVDF Membran (0,2 µm)	BIORAD
Konische Röhrchen (15 ml, 50 ml)	BD Falcon
LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I Kit	Roche
LightCycler® Kapillaren (20 µl)	Roche
MACS LS magnetische Separationssäulen	Miltenyi Biotec
Parafilm	American National Can™
Pipettenspitzen	Eppendorf
Pipettenspitzen	Sarstedt
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf
Reverse Transcription System	Promega

Serologische Einwegpipetten (5 ml, 10 ml)	Sarstedt
Serologische Einwegpipetten (25 ml, 50ml)	Corning Costar®
Sterile Einmalspritzen(1,0 ml)	BD Plastipak
Sterile Filter-Spitzen (100 µl, 200 µl)	Biozym Diagnostik
Sterile Filter-Spitzen (10 µl, 1000 µl)	Sarstedt
Sterile Kanülen	BD Microlance™
Vacutainer®CPT™ (8 ml)	Becton Dickinson (BD)
Vacutainer Systems Safety-Lok™ Blood Collection Set	Becton Dickinson (BD)
Vacutainer Systems PrecisionGlide™ (0,8 bzw. 0,9 x 38 mm)	Becton Dickinson (BD)
Zellkulturplatten (6-, 24-, 48 Loch)	BD Falcon
Zellkulturplatten (96 Loch)	Corning Costar®

2.1.3 Chemikalien

7-AAD	Sigma
9-cis-Retinsäure	Sigma
25-Hydroxycholesterin	Sigma
Acrylamidlösung (40%)	BIORAD
Adiponektin, human, rekombinant	R&D Systems
AICAR	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS)	BIORAD
Biosafe™ Coomassie	BIORAD
Bisacrylamidlöung (2%)	BIORAD
Bromphenolblau	Sigma
BSA (fettsäure-frei)	Roche
BSA (Fraktion 5)	Biomol
BSA (Fraktion 5)	Sigma
CaCl ₂	Fluka
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Desoxycholate	Sigma
Desoxynukleosid-Triphosphat-Set	Roche
Dithiothreitol	Biorad

DNA-Leiter, 1kb	Invitrogen
DULBECCO'S·MEM	Biochrom AG
Essigsäure (99%)	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Merck
EDTA	Merck
FCS	Biochrom AG
Fenofibrat	Sigma
Full Range Rainbow™ Proteinstandard	Amersham Biosciences
Glutardialdehydlösung (50%)	Merck
Glyzerin	Merck
Glyzin	Merck
IL-6	R&D Systems
IL-8	R&D Systems
Kaliumchlorid	Merck
Kupfer(II)sulfat	Sigma
LPS	Sigma
MACS CD14 Micro Beads	Miltenyi Biotec
Methyl-β-Cyclodextrin	Sigma
Magermilchpulver	Vitalia
Magnesiumchlorid	Sigma
Metformin	Sigma
β-Mercaptoethanol	Sigma
Methanol, technisch	Chemikalienausgabe
Natriumacetat-Trihydrat	Merck
Natriumazid	Fluka
Natriumchlorid	Merck
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Merck
Nukleasefreies Wasser	Promega
Ölsäure	Sigma
Palmitinsäure	Sigma
Penicillin-Streptomycin-Lösung	PAN
Pioglitazon	Sigma
PBS·DULBECCO	Biochrom·AG

PMA	Sigma
RPMI 1640	Biochrom-AG
Salzsäure rauchend	Merck
SB 203580 (p38 MAP-Kinase Inhibitor)	Calbiochem®
SDS	Merck
TEMED	Merck
Thromborel® S	Dade Behring
Tris-HCl	Merck
Tris-NH ₃	Merck
Trypsin/EDTA	Gibco
Tween® 20	Sigma

2.1.4 Antikörper

2.1.4.1 Antikörper für Western-Blotting

2.1.4.1.1 Primäre Antikörper

Anti-Annexin A6 polyklonaler Antikörper	Carlos Enrich
Anti-CD163 monoklonaler Antikörper	Morphosys AbD
Anti-GAPDH monoklonaler Antikörper	Cell Signaling

2.1.4.1.2 Sekundäre Antikörper

Anti-Kaninchen Peroxidase-konjugierter Antikörper	Jackson Immuno Research
Anti-Maus Peroxidase-konjugierter Antikörper	Jackson Immuno Research

2.1.4.2 Antikörper für Durchflusszytometrie

APC anti-human CD14 Antikörper	Becton Dickinson
APC anti-human IgG2b-κ monoklonaler Antikörper	Becton Dickinson

2.1.5 Kit-Systeme

BCA™ Protein Assay Kit	Pierce
ECL Plus Western Blotting Detection Reagent	Amersham Bioscience
LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche
Reverse Transcription System	Promega

2.1.6 Puffer und Lösungen

Im folgenden Abschnitt wird die Zusammensetzung aller selbst hergestellten Puffer und Lösungen beschrieben. Sofern nicht anders angegeben, erfolgte die Lagerung bei Raumtemperatur.

2.1.6.1 Lösungen für Arbeiten mit Proteinen

2.1.6.1.1 Lösungen für die Herstellung von Proteinextrakten

RIPA-Lysepuffer:

NaCl, 3 M Stammlösung	2,5	ml
Igepal	500	µl
Desoxycholate	0,25	g
SDS, 20%ige Stammlösung	250	µl
Tris, 1 M Stammlösung, pH 7,5	2,5	ml
	ad 50 ml ddH ₂ O	

Vor Gebrauch wurde pro 10 ml RIPA-Lysepuffer eine Tablette Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail zugegeben. Der Puffer wurde dann für höchstens zwei Wochen bei 4°C aufbewahrt.

2.1.6.1.2 Lösungen für SDS-PAGE

SDS-Probenpuffer (2 x Lämmli):

Glyzerin (87 %)	2	ml
Tris-HCl, 1 M Stammlösung, pH 6,8	120	µl
SDS, 20%ige Stammlösung	2	ml
β-Mercaptoethanol	1	ml
Bromphenolblau	0,025	g
	ad 10 ml ddH ₂ O	

SDS-Probenpuffer (5x Lämmli):

Glyzerin	5	ml
Tris-HCL, 1 M Stammlösung, pH 6,8	300	µl
SDS, 20%ige Stammlösung	2	ml
β-Mercaptoethanol	1	ml
Bromphenolblau	10	mg
	ad 10 ml ddH ₂ O	

Die SDS-Probenpuffer wurden im Verhältnis 1:1, bzw. 4:1 mit der jeweiligen Probe vermischt.

SDS-Gellaufpuffer, 10-fach:

Glyzin	144	g
Tris-NH ₃	30	g
SDS, 20%ige Stammlösung	50	ml
	ad 1 l ddH ₂ O	

Lösung für 15%ige Trenngele:

Acrylamid 40%	30,0	ml
Bisacrylamid 2%	3,4	ml
Tris-HCl, 3 M Stammlösung, pH 8,7	10,0	ml
SDS, 20%ige Stammlösung	0,4	ml
ddH ₂ O	32,0	ml

Lösung für 10%ige Trenngele:

Acrylamid 40%	15,0	ml
Bisacrylamid 2%	3,4	ml
Tris-HCl, 3 M Stammlösung, pH 8,7	7,5	ml
SDS, 20%ige Stammlösung	0,3	ml
ddH ₂ O	28,5	ml

Lösung für 5%ige Sammelgele:

Acrylamid 40%	5,0	ml
Bisacrylamid 2%	2,6	ml
Tris-HCl, 3 M Stammlösung, pH 6,8	5,0	ml
SDS, 20%ige Stammlösung	0,2	ml
ddH ₂ O	24,0	ml

Die Acrylamidlösungen wurden bei 4°C aufbewahrt. Unmittelbar vor dem Gießen des Trenn- bzw. Sammelgels wurde der Acrylamidlösung 10%ige APS-Lösung im Verhältnis 1:167 und TEMED im Verhältnis 1:334 zugegeben.

2.1.6.1.3 Lösungen für Western-Blotting**Tank-Puffer, 10-fach:**

Glyzin	140	g
Tris-NH ₃	30	g
SDS	5	g
	ad 1	l ddH ₂ O

Wettransfer-Puffer:

Methanol (technisch)	200	ml
Tank-Puffer, 10-fach	80	ml
	ad 1	l ddH ₂ O

PBST:

Tween® 20	1	ml
	ad 1	l PBS

TBST:

Tween® 20	1	ml
	ad 1	l TBS

Blockierlösung:

Magermilchpulver	5	g
	ad 100 ml	PBST

Die Blockierlösung wurde bei 4°C aufbewahrt.

BSA-PBST:

BSA	7,5	g
Natriumazid	0,5	g
Tween® 20	0,5	ml
	ad 0,5 l	PBS

Die Lösung wurde steril filtriert und bei 4°C aufbewahrt. Primäre Antikörper wurden in dieser Lösung im Verhältnis 1:1000 verdünnt.

2.1.6.2 Lösungen für die Isolierung peripherer humaner Monozyten**CD14-Beadspuffer:**

BSA	0,5	g
EDTA, 0,5 M Stammlösung, pH 8,0	2,0	ml
	ad 0,5 l	PBS

Der CD14-Beadspuffer wurde steril filtriert und für höchstens zwei Wochen bei 4°C aufbewahrt.

2.1.7 Primer für LightCycler-Analysen

Die Primer für die LightCycler® Expressionsanalysen wurden jeweils zu beiden Seiten eines Introns gewählt, um die Amplifizierung genomischer DNA zu vermeiden. Die Länge der amplifizierten Fragmente von 90 bis 233 bp garantierte möglichst kurze Elongationszeiten. Außerdem wurden die Primer so entworfen, dass die Annealing-Temperatur etwa 60°C betrug. Die Primer wurden von der Firma Metabion synthetisiert und ihre Spezifität durch Sequenzierung der PCR-Produkte durch die Firma GeneArt verifiziert.

Oligonukleotid	Sequenz (5'→ 3')	Größe
Annexin A6		
AnxA6_uni	TGGCCTATCAGATGTGGGAAC	90 bp
AnxA6_rev	CTGCGTCAGGGTTGAAGTCAT	
β-Actin		
β-Actin_uni	CCAGGGTGTGATGGTGGGAATG	233 bp
β-Actin_rev	CGCACGATTTCCCTCTCAGCTC	

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung peripherer humaner Monozyten aus Vollblut

Alle Spender wurden zunächst über die Risiken der Versuchsreihen aufgeklärt und mussten eine schriftliche Einverständniserklärung abgeben. Darüber hinaus wurde das Studiendesign von der Ethikkommission der Universität Regensburg genehmigt und entsprechend der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

Unmittelbar nach der Blutentnahme invertierte man die mit jeweils 8 ml Vollblut gefüllten Vacutainer mehrmals, um das Natriumcitrat im Röhrchen mit dem Blut zu vermischen und um dadurch eine Gerinnung zu verhindern. Anschließend wurden die Vacutainer bei 1700 g für 25 min bei RT zentrifugiert. Durch diesen Zentrifugationsschritt und das Polyestergerel in den Vacutainern trennten sich die Blutbestandteile auf. Erythrozyten und andere schwere Komponenten gelangten dabei aufgrund ihrer höheren Dichte durch die Gelschicht zum Boden des Röhrchens, während leichtere Bestandteile, wie etwa das Plasma und mononukleäre Zellen, das Gel nicht durchwandern konnten. Nachdem die Vacutainer erneut 5-6 mal invertiert worden waren, wurden sie unter der Sterilbank geöffnet und das Plasma und die mononukleären Zellen eines Spenders in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 300 g für 15 min und bei RT. Danach nahm man das Plasma vorsichtig ab, überführte es in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen und verwendete es für die Herstellung von autologem Serum (s. 2.2.2). Das Zellpellet wurde in 20 ml PBS gewaschen und nochmals für 10 min bei RT zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen worden war, wurde das Zellpellet in 2 ml CD14-Beadspuffer resuspendiert, in ein Eppendorfcup überführt und einem weiteren Zentrifugationsschritt unterzogen (300 g, 10 min, RT). Anschließend erfolgte die Resuspension des Pellets in CD14-Beadspuffer (160 µl pro 6 Vacutainer) und die Inkubation mit CD14 Micro Beads (40 µl pro 6 Vacutainer) für 20 min bei 4°C. Während dieser Inkubationsphase wurde das Eppendorfcup ca. alle 5 min angeschnippt, um eine gute Durchmischung von Beads und Zellen zu gewährleisten. Dabei lagerten sich die monoklonalen CD14-Antikörper, an die magnetische Beads gekoppelt sind, an das Oberflächenantigen CD14 an, welches ausschließlich von Monozyten exprimiert wird.

Um nun die Monozyten von anderen Zellen trennen zu können, wurde ein Magnetfeld angelegt, in welchem einerseits die mit Beads markierten Monozyten festgehalten wurden und welches andererseits von unerwünschten Zellen passiert werden konnte. Hierzu gab man der Zellsuspension nach der Inkubation 1 ml CD14-Beadspuffer zu und zentrifugierte bei 300 g erneut für 10 min bei RT. Schließlich wurde das Zellpellet in 2 ml CD14-Beadspuffer aufgenommen. Die Zellsuspension wurde anschließend auf LS Separationssäulen geladen, die in einem Magneten eingespannt waren und vorher mit 3 ml CD14-Beadspuffer äquilibriert wurden. Nach drei Waschschritten mit je 3 ml CD14-Beadspuffer erfolgte die Elution der Monozyten mit 5 ml CD14-Beadspuffer. Hierzu wurden die Säulen nacheinander aus dem Magnetfeld entfernt und in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen gestellt. Anschließend wurden die monozytären Zellen abzentrifugiert (300 g, 5 min, RT) und der Überstand verworfen.

Dann wurden die Zellen in jeweils 5 ml RPMI Medium resuspendiert und hiervon ein 10 µl Aliquot in der Neubauer Zellzählkammer ausgezählt, um die Zellzahl zu ermitteln. Die Zellen kultivierte man schließlich in RPMI Medium mit 10 % autologem Serum in 6-Loch Platten (3 Mio. Zellen/Loch).

2.2.2 Herstellung von autologem Serum

Für die Durchführung von *in vitro* Experimenten mit Monozyten benötigte man autologes Serum, das aus Plasma hergestellt wurde.

Vorab wurde PBS auf 4°C gekühlt sowie Thromborel in 10 ml destilliertem Wasser gelöst und für mindestens 30 Minuten bei 37°C gelagert.

Zum Plasma, das während der Monozyten-Isolation gewonnen wurde (s. 2.2.1), gab man eine Spatelspitze Calciumchlorid und 1 % gelöstes Thromborel. Nachdem das Plasma für 10 min bei 37°C inkubiert worden war, wurde mit einer Pasteurpipette das Gerinnungsprodukt von der Innenwand des Zentrifugenröhrchens vorsichtig gelöst und für 30 min bei 2500 g und 4°C zentrifugiert. Das so gewonnene Serum konnte in einen Dialyseschlauch überführt und gegen gekühltes PBS dialysiert werden. Nach einer Stunde wechselte man das PBS und es erfolgte ein weiterer Dialyseschritt. Abschließend wurde das Serum steril filtriert.

2.2.3 Stimulierung primärer Monozyten

Jeweils 3 Mio. Monozyten pro Loch wurden auf 6-Loch Platten ausgesät und in 3 ml RPMI Medium mit 10% autologem Serum aufgenommen. Die Zellen wurden für 24 h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Am folgenden Tag erfolgte ein Mediumwechsel und die Stimulation der Zellen mit den entsprechenden Substanzen für weitere 16 h bzw. 24 h. Anschließend konnte der Überstand zellfrei abgenommen und die Zellen mit 500 µl kaltem PBS + Complete Protease Inhibitor gewaschen werden. Zur RNA-Isolierung wurden die Zellen in 500 µl TRIzol geschabt und bei -20°C gelagert. Für das Arbeiten mit Proteinen wurde das Zellpellet nach dem Waschen in 500 µl PBS + Complete Protease Inhibitor geschabt und für 5 min bei 300 g und RT zentrifugiert. Anschließend konnte der Überstand verworfen, das Pellet in 40 µl RIPA-Lysepuffer resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt werden.

2.2.4 Arbeiten mit cDNA/ RNA

2.2.4.1 Isolierung von RNA

Die Isolation von RNA aus Monozyten erfolgte nach dem Prinzip der Phenol/Chloroform Extraktion: Die Monozyten in 500 µl TRIzol wurden mit jeweils 1/5 Volumen Chloroform (100 µl) versetzt und das Gefäß 4 - 5 mal invertiert. Nach einer Inkubation über 2 min bei RT wurde der Ansatz für 15 min bei 12000 g zentrifugiert. Die so entstandene klare obere wässrige Phase zog man ab, überführte es in ein anderes Eppendorfcup und versetzte es wiederum mit 1/5 Volumen Chloroform. Durch die Wiederholung der bisherigen Schritte konnte der Reinheitsgrad der isolierten RNA erhöht werden. Zu der wässrigen Phase wurde dann Isopropanol (0,7 Vol.) gegeben, das zum Ausfällen der RNA führt und das Eppendorfcup mehrmals invertiert. Es folgte eine Inkubation über 10 min auf Eis und eine anschließende Zentrifugation für 30 min bei 12000 g und 4°C. Der Überstand konnte verworfen und das Pellet vorsichtig mit vorgekühltem 70%igem Ethanol gewaschen werden. Nach einer weiteren Zentrifugation über 15 min bei 12000 g und 4°C wurde der Ethanol vorsichtig abgenommen und das Pellet getrocknet. Die so gewonnene RNA wurde in 40 µl nukleasefreiem Wasser aufgenommen und vor der Konzentrationsbestimmung für mindestens 2 h bei -80°C aufbewahrt.

2.2.4.2 Konzentrationsbestimmung von RNA

Zur Konzentrationsbestimmung von RNA wurde das NanoDrop UV/Vis-Spektralphotometer (Peglab) verwendet. Hierzu wurde jeweils 1 μl unverdünnte Probe vermessen. Als Kontrolle diente nukleasefreies Wasser.

Unter Berücksichtigung der jeweils gemessenen Extinktion bei 260 nm (E_{260}) und des für RNA spezifischen Extinktionsfaktors (ϵ_{RNA}) von $40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ konnte mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes die RNA-Konzentration berechnet werden:

$$C_{\text{RNA}} = E_{260} \cdot \epsilon_{\text{RNA}} \cdot V$$

C_{RNA} : Konzentration der RNA in der Lösung [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]

E_{260} : Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm

ϵ_{RNA} : Extinktionskoeffizient von RNA, gleich $40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

V: Verdünnungsfaktor, hier 1

Über die Reinheit der RNA konnte durch zusätzliche Messungen der Extinktion bei 280 nm und bei 320 nm eine Angabe gemacht werden, wobei bei 280 nm eine Verunreinigung mit Proteinen und bei 320 nm eine Verunreinigung mit organischen Resten festgestellt werden kann. Bei reiner, nicht degradiertes RNA liegt das Verhältnis von E_{260} zu E_{280} zwischen 1,5 und 2,0.

2.2.4.3 Reverse Transkription

Um die aus Monozyten isolierte Gesamt-RNA in Real-Time PCR-Reaktionen einsetzen zu können, musste diese zunächst mit der Reversen Transkriptase des Avian-Myoblastosis-Virus (AMV-RT) in einzelsträngige cDNA überführt werden. Hierzu kamen Random Hexamer Primer zum Einsatz, die an komplementären Sequenzen innerhalb der RNA-Moleküle hybridisierten und die als Ausgangspunkt für die Synthese des cDNA-Stranges an der RNA-Matrize durch die Reverse Transkriptase dienten. Ein Ansatz für diese Reaktion setzte sich dabei aus folgenden Komponenten zusammen:

MgCl ₂ , 25 mM	8	μl
RT-Puffer, 10 x	4	μl
dNTP-Mix, 10 mM	4	μl
Random Hexamer Primer, 0,5 μg/μl	1	μl
RNAsin Ribonuklease-Inhibitor, 40 U/μl	0,5	μl
AMV-Reverse Transkriptase, 25 U/μl	1,2	μl
RNA (0,5 μg) in nukleasefreiem Wasser	21,3	μl

Der Reaktionsansatz wurde zunächst für 1 h bei 42°C inkubiert und, nach Ablauf der Reaktion, für 5 min auf 95°C erhitzt, wodurch die Inaktivierung der AMV-RT erfolgte. Anschließend konnte die cDNA bei -20°C gelagert werden.

2.2.5 Real-Time RT-PCR

Die Real-Time RT-PCR ist ein Untersuchungsverfahren, bei der einerseits, basierend auf dem Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR), Nukleinsäuren vervielfältigt und diese andererseits durch Fluoreszenzmessung während des Reaktionsablaufs („real-time“) quantifiziert werden können. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde hierbei in allen Experimenten SYBR Green I verwendet. SYBR Green I lagert sich in die kleine Grube doppelsträngiger DNA ein und kann nur in diesem gebundenen Zustand Licht emittieren. Dadurch nimmt die Fluoreszenz mit zunehmendem Gehalt an doppelsträngiger DNA proportional zu.

Um die Genexpression in primären Monozyten bestimmen zu können, wurde zunächst die RNA der Zellen in einzelsträngige cDNA überführt. Dann wurde ein Master-Mix hergestellt, der bereits alle nötigen Reagenzien enthielt und dem nur noch die zu untersuchende cDNA zugesetzt werden musste. Der Master-Mix für eine Reaktion setzte sich dabei wie folgt zusammen:

Reaktionsmix (Roche)	2,0	μl
MgCl ₂ , 25 mM	2,4	μl
universe Primer, 5 pmol/μl	1,0	μl
reverse Primer, 5 pmol/μl	1,0	μl
ddH ₂ O	11,6	μl

Für die Reaktion erforderliches SYBR Green I, Reaktionspuffer, dNTPs und HotStart Taq-Polymerase waren im Reaktionsmix (Roche) bereits enthalten.

Der Master-Mix konnte dann auf LightCycler® Kapillaren aufgeteilt werden, wobei jeweils 18 µl Master-Mix vorgelegt wurden. Nach der Zugabe von 2 µl der jeweiligen cDNA bzw. nukleasefreiem Wasser als Kontrolle erfolgte die Zentrifugation der Kapillaren in der LC Carousel Centrifuge. Anschließend wurden die Proben in das LightCycler® Gerät gestellt und das jeweilige PCR Programm gestartet. Die Proben erhitze man zunächst für 10 min auf 95°C, um die Taq-Polymerase zu aktivieren. Anschließend wurden 45 Amplifizierungszyklen durchgeführt, wobei sich ein Zyklus aus 15 s Denaturierungsphase bei 95°C, 10 s Annealingphase bei etwa 60°C (primerspezifisch) und 10 s Elongationsphase bei 72°C zusammensetzte.

Nach Abschluss der Elongationsphase konnte am Ende eines jeden Amplifikationszyklus die Fluoreszenz bei einer für das PCR-Produkt geeigneten Temperatur (75-85°C) gemessen werden.

Für jede Probe wurde ein spezifischer Crossing Point (Cp) bestimmt, indem in einem Graphen die Fluoreszenzmesswerte gegen die Zyklenzahl aufgetragen wurden. Der Cp beschreibt den Reaktionszyklus, in dem die gemessene Fluoreszenz gegenüber dem Hintergrund einen deutlich positiven Wert annimmt. Außerdem ist der Cp umgekehrt proportional zur Ausgangskonzentration der cDNA. Verschiedene Proben benötigen demnach in Abhängigkeit ihrer Ausgangskonzentration eine unterschiedliche Anzahl an Amplifikationszyklen, um den Cp zu erreichen.

Damit nun verschiedene PCR-Reaktionen miteinander verglichen werden konnten, bediente man sich einer Standardkurve: Hierzu erstellte man eine 1:1-Verdünnungsreihe mit vier Standardproben der betreffenden Monozyten-cDNA und wies jeder der vier Standardproben einen definierten Wert zu (50 ng, 25 ng, 12,5 ng und 6,25 ng). Durch die Auftragung der Cp-Werte der Standardproben gegen den Logarithmus der jeweiligen Konzentration entstand eine Standardkurve, die jedem Cp eine bestimmte Konzentration zuordnete.

Um eine Aussage über die Regulation eines bestimmten Zielgens treffen zu können, musste von jeder Probe zusätzlich ein sog. Housekeeping Gen (hier β -Actin) bestimmt werden, das durch die jeweilige Stimulation nicht reguliert wurde. Der Quotient aus den cDNA-Konzentrationen des Zielgens und des β -Actins ergab einen zum Housekeeping Gen normalisierten Wert, der einen Vergleich der einzelnen Proben untereinander zuließ.

Die Spezifität der PCR-Produkte konnte nach der Amplifikationsphase durch eine Schmelzkurve überprüft werden: Dazu wurde die cDNA langsam (0,1°C/s) von 60°C auf 95°C erhitzt und analog die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. Da jede spezifische Reaktion auch nur ein spezifisches Produkt bildet, das bei einer bestimmten Temperatur schmilzt, nimmt an diesem Schmelzpunkt die Fluoreszenz abrupt stark ab. Entstehen jedoch durch unspezifische Reaktionen (Verunreinigungen) mehrere Produkte, so finden sich in der Schmelzkurve mehrere Scheitelpunkte.

2.2.6 Arbeiten mit Proteinen

2.2.6.1 Präparation von Gesamtzellextrakten

Zur Präparation von Gesamtzellextrakten aus Monozyten nahm man zunächst den Überstand ab und überführte ihn in ein Eppendorfcup. Die Löcher der 6-Loch Platten wurden dann mit 500 µl kaltem PBS, das mit einem Proteaseinhibitor versetzt war, gewaschen. Anschließend konnten die primären Monozyten in 500 µl frischem PBS + Proteaseinhibitor mit einem Schaber vom Boden der Zellkulturplatten gelöst und in neue Eppendorfcups pipettiert werden. Schließlich wurden die Zellen für 5 min bei 300 g und RT abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 40 µl vorgekühltem RIPA-Zellysepuffer mit Proteaseinhibitoren aufgenommen. Abschließend wurden mit Ultraschall sowohl die Zellen mechanisch lysiert als auch die genomische DNA geschert. Die Proben konnten so bei -20°C aufbewahrt werden.

2.2.6.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte nach der Bicinchoninsäure (BCA) - Methode. Dazu verdünnte man die Proben 1:10 in PBS. Davon wurden wiederum 10 µl mit 200 µl der Reaktionslösung versetzt. Diese bestand aus einem Gemisch aus Bicinchoninsäure und 4%iger Kupfer-II-Sulfatlösung im Verhältnis 1:50. Der Reaktionsansatz konnte anschließend für 30 min bei 37°C inkubiert werden. Hierbei reduzierten die Proteine die Cu²⁺-Ionen zu Cu¹⁺-Ionen, die wiederum mit der Bicinchoninsäure einen violetten BCA-Cu¹⁺-Komplex bildeten. Schließlich konnte die

Extinktion bei 540 nm bestimmt und über eine BSA-Standardkurve die Proteinmenge errechnet werden.

2.2.6.3 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der SDS-PAGE können Proteine gemäß ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. Hierzu werden die Proteine mit einem 2x SDS-Probenpuffer im Verhältnis 1:1, bzw. mit einem 5x SDS-Probenpuffer im Verhältnis 4:1 versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Das β -Mercaptoethanol, das im Probenpuffer enthalten ist, denaturiert die Proteine. Zudem lagert sich das negativ geladene SDS des Probenpuffers gleichmäßig an die aufgefalteten Proteine an und überdeckt so ihre Eigenladung. Auf diese Weise entsteht eine konstant negative Ladung pro Masseneinheit Protein, die es ermöglicht, die einzelnen Proteinfragmente ausschließlich nach ihrer Größe und ihrem Gewicht aufzutrennen.

Alle Gele wurden kurz vor Gebrauch frisch gegossen und bestanden jeweils aus einem Sammel- und einem Trenngel. Die jeweilige Trenngel-Stammlösung wurde mit den entsprechenden Mengen an 10%igem APS und TEMED versetzt und zwischen 2 Glasplatten gegossen. Das Gel überschichtete man mit Wasser, um eine glatte Begrenzung zu erreichen. In das Sammelgel wurde ein Kamm eingesetzt, um Taschen auszubilden. Das Sammelgel diente zur Ausbildung einer einheitlichen Lauffront. Die so hergestellten Gele wurden dann in eine Gelelektrophoreseapparatur eingespannt und vollständig mit 1x SDS-Gellaufpuffer bedeckt. Die Auftragung eines Proteinstandards diente zur Abschätzung der Größe der aufgetrennten Proteine. Die Elektrophorese erfolgte schließlich bei 25 mA pro Gel für ca. 60 min.

2.2.6.4 Western-Blotting

Unter Western-Blotting versteht man den Transfer von Proteinen aus einem SDS-Gel auf eine PVDF-Membran und die anschließende immunochemische Detektion der transferierten Proteine.

Hierzu kam die Wettransfer-Methode zur Anwendung: Nach der SDS-PAGE wurden die Gele zusammen mit der kurz in Methanol befeuchteten PVDF-Membran, dem Whatman-Filterpapier und den Schwämmchen in Wettransfer-Puffer äquilibriert.

Anschließend wurde der Blot folgendermaßen aufgebaut: Die Basis bildete ein Schwämmchen, auf das zwei Whatman-Filterpapiere in der Größe des Gels gelegt wurden. Darauf platzierte man nun mittig die PVDF-Membran und darauf wiederum das Gel. Überdeckt wurde das Ganze erneut von zwei Whatman-Filtern und einem weiteren Schwämmchen. Nach jeder Schicht rollte man mit einem Plastikröhrchen vorsichtig über die Oberfläche, um Luftblasen zu entfernen, die den Blotvorgang stören würden. Das auf diese Weise entstandene Paket legte man schließlich zwischen eine Klemme und spannte es so in eine Blotkammer, dass die Membran zur Anode und das Gel zur Kathode zeigte. Die Kammer wurde nun vollständig mit Wettransfer-Puffer gefüllt und zusätzlich mit einer Durchlaufkühlung bzw. einem Eisblock versehen. Der Transfer der Proteine erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80 V für 90 min.

Nach dem Blotvorgang wurden die PVDF-Membranen für eine Stunde in Blockierlösung gelegt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach mehrmaligem Waschen mit PBST konnte dann der in BSA-PBST verdünnte primäre Antikörper zugegeben werden. Die Inkubation der Membranen mit dem primären Antikörper erfolgte meist über Nacht bei 4°C oder mindestens für 2 h bei RT. Im Anschluss wurde die Membran gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Es folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, der mit einer Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert ist, in 10 ml Blockierlösung. Der sekundäre Antikörper wurde im Verhältnis 1:5000 verdünnt, die Membranen damit für 60 Minuten inkubiert und anschließend wieder gewaschen. Zur Detektion der HRP kam die ECL Plus Western Blotting Detection Reagent Lösung zur Anwendung. Die beiden Reagenzien der ECL-Lösung wurden laut Herstellerangaben gemischt und sofort 1 ml auf die Membran gegeben. Nach 5 Minuten Inkubation entfernte man überschüssiges ECL-Reagenz und legte die Membran in einer Klarsichtfolie in eine lichtdichte Filmkassette. Die Detektion der Chemilumineszenzsignale erfolgte mit Hyperfilm ECLTM, abhängig von der Intensität des Signals, über einen Zeitraum von 1 min bis zu 60 min.

Um eine Aussage über den Effekt einer bestimmten Stimulierung auf die Expression von Proteinen machen zu können, wurden die Membranen zusätzlich mit Anti-GAPDH primären Antikörpern inkubiert. Man setzte dabei voraus, dass keine der Stimulierungen eine Auswirkung auf die Expression dieses Proteins hatte.

2.2.7 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein molekularbiologisches Verfahren, mit deren Hilfe Einzellzellen erfasst, quantifiziert oder auch sortiert werden können. Dabei werden Zellen in einer Trägersubstanz so durch eine Kapillare gezogen, dass sie einzeln durch einen Laserstrahl geführt werden. Das entstehende Streulicht des Laserstrahls wird von Photodetektoren registriert. Es wird zwischen dem Vorwärts- und dem Seitwärtsstreulicht unterschieden, wobei das Vorwärtsstreulicht (FSC=Forward Scatter) zur Analyse der Zellgröße und das Seitwärtsstreulicht (SSC=Side Scatter) zur Analyse der Granularität der Zellen verwendet wird. Überdies können bei der Durchflusszytometrie durch das Anlegen von unterschiedlichen Schleusen (Gates) im Streulichtdiagramm Bereiche ausgewählt werden, die unterschiedliche Zellpopulationen widerspiegeln.

Zur genaueren Charakterisierung der verschiedenen Zellpopulationen können Fluorochrom-konjugierte Antikörper verwendet werden. Dabei wird das Fluorochrom vom Laserlicht angeregt und dessen spezifisches Emissionsspektrum von einem Detektor aufgenommen. Da sich jedoch das Emissionsspektrum der Farbstoffe bei einer bestimmten Wellenlänge überlagern kann, muss diese Überlagerung bei der Auswertung berücksichtigt werden (Kompensation).

Die isolierten Monozyten wurden zur Analyse im Durchflusszytometer in CD14-Beadspuffer aufgenommen und mit entweder 5 µl APC Anti-human CD14-Antikörpern oder mit 5 µl APC Anti-human IgG2b-κ monoklonalen Antikörpern als Isotypkontrolle für 30 min im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden dann mit PBS gewaschen und in 200 µl PBS resuspendiert. Anschließend gab man zu jedem Ansatz 5 µl 7-AAD und inkubierte nochmals für 10 min im Dunkeln bei 4°C. 7-AAD dient dabei als Vitalitätsmarker, welcher an die DNA bindet und nur in nicht lebende Zellen eindringen kann.

2.2.8 Statistische Auswertungen

Es sind jeweils die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen angegeben.

Für statistische Auswertungen diente SPSS 15.0 für Windows, wobei der Student's t-Test zur Anwendung kam und Werte für $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen wurden.

3 Ergebnisse

3.1 Isolierung peripherer humaner Monozyten aus Vollblut

3.1.1 Titration der MACS CD14 Micro Beads

Es wurde zunächst die Konzentration an CD14 Micro Beads ermittelt, bei der die isolierten Monozyten einerseits über eine akzeptable Reinheit verfügen und andererseits die Isolierung mit möglichst geringen Kosten verbunden ist.

Hierzu isolierte man von vier gesunden Spendern (mittleres Alter $25,5 \pm 1,7$ Jahre; 3 Männer, 1 Frau) Monozyten aus Vollblut.

Um das optimale Verhältnis zwischen mononukleären Zellen und CD14 Micro Beads zu ermitteln, wurden die mononukleären Zellen nach Separation aus je 8 ml Vollblut wie folgt resuspendiert (Tabelle 2):

Versuchsansatz pro 8 ml Vollblut	CD14-Beadspuffer	CD14 Micro Beads
100% (gemäß Herstellerprotokoll)	330 μl pro 8 ml	66 μl pro 8 ml
60%	200 μl pro 8 ml	40 μl pro 8 ml
40%	133 μl pro 8 ml	26,7 μl pro 8 ml
10%	33 μl pro 8 ml	6,6 μl pro 8 ml
6%	20 μl pro 8 ml	4 μl pro 8 ml
4%	13,3 μl pro 8 ml	2,7 μl pro 8 ml
1%	3,3 μl pro 8 ml	0,7 μl pro 8 ml

Tabelle 2: Versuchsansätze zur Ermittlung der optimalen Konzentration an CD14 Micro Beads.

3.1.2 Anzahl der isolierten Monozyten in Abhängigkeit von der CD14 Micro Beads Konzentration

Nach der Eluierung der Monozyten wurden jeweils 10 μl in der Neubauer Zellzählkammer ausgezählt.

Mit dem Standardprotokoll entsprechend Herstellerangaben konnten von Spender 1 $0,66 \times 10^6$, von Spender 2 $0,61 \times 10^6$, von Spender 3 $1,22 \times 10^6$ und von Spender 4

$1,96 \times 10^6$ Zellen isoliert werden. Diese Werte wurden für die folgenden Berechnungen gleich 100% gesetzt. Für eine Beads-Konzentration von 60% stieg die Zellzahl auf $113,8 \pm 26,1\%$ ($p=0,03$ gegenüber dem Standardprotokoll); für den 40%- bzw. 10%-Ansatz konnten immer noch $101,3 \pm 13,9\%$ ($p=0,40$ gegenüber dem Standardprotokoll) bzw. $105,5 \pm 25,8\%$ ($p=0,09$ gegenüber dem Standardprotokoll) Zellen isoliert werden. Bei geringeren Beads-Konzentrationen nahm die Zahl der isolierten Monozyten jedoch stark ab. So konnten bei 6% der empfohlenen Menge an CD14 Micro Beads nur noch $77,8 \pm 34,5\%$ ($p=0,05$ gegenüber dem Standardprotokoll) und bei 4% lediglich $17,7 \pm 14,3\%$ ($p<0,001$ gegenüber dem Standardprotokoll) der Monozyten separiert werden. Auch beim 1%-Ansatz lag die Ausbeute an Zellen signifikant unter dem Wert, der unter Verwendung des Herstellerprotokolls erzielt werden konnte ($15,4 \pm 5,9\%$; $p<0,001$) (s. Abbildung 4).

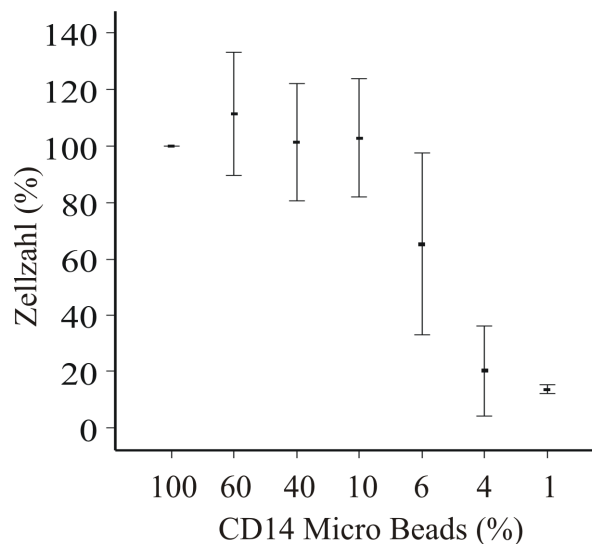


Abbildung 4: Die Zellzahl der Monozyten, die mit geringeren Mengen an CD14 Micro Beads isoliert wurde, ist relativ zur Zellzahl angegeben, die mit dem Standardprotokoll (=100%) gereinigt werden konnte.

3.1.3 Anzahl der Monozyten im Durchfluss in Abhängigkeit von der CD14 Micro Beads Konzentration

Um abschätzen zu können, wie viele Monozyten beim Eluieren aus der LS Separationssäule verloren gehen, wurde der Durchfluss, die Negativ-Fraktion, im Durchflusszytometer vermessen (Abbildung 5).

Hierzu wurde zum Eluat APC anti-human CD14 Antikörper bzw. APC anti-human IgG2b- κ zugegeben und, nach erfolgter Inkubation, im Durchflusszytometer vermessen. Die Anzahl der Zellen, die bei dem Versuch, durchgeführt laut Herstellerangaben, verloren ging, wurde wieder gleich 100% gesetzt. Für den 60%-Ansatz waren im Durchfluss lediglich $60,0 \pm 8,7\%$ Monozyten enthalten ($p=0,007$ gegenüber dem Standardprotokoll). Betrug die Beads-Konzentration 40% des empfohlenen Wertes, waren es $98,2 \pm 11,9\%$. Bei Verwendung von 10% CD14 Micro Beads, bezogen auf die Herstellerangaben, stieg jedoch das Ausmaß nicht zurückgehaltener Zellen auf $132,2 \pm 42,6\%$ an, bei 6% Beads betrug die Zahl $125,9 \pm 35,0\%$ ($p=0,04$ gegenüber dem Standardprotokoll). Statistisch signifikant erhöht war auch die Anzahl der verloren gegangenen Monozyten, wenn nur noch 1% der vom Hersteller vorgegebenen Beads-Konzentration eingesetzt wurde ($332,2 \pm 109,2\%$; $p=0,03$ gegenüber Standardprotokoll) (Abbildung 5).

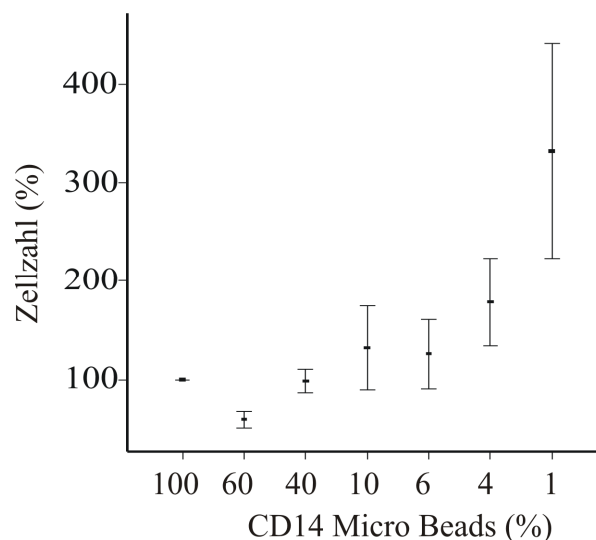


Abbildung 5: Anzahl der Monozyten in % im Durchfluss. Der Wert, der bei Verwendung des Standardprotokolls erzielt wurde, entspricht 100%.

3.1.4 Reinheit der isolierten Monozyten

Für die Beurteilung der Reinheit der Monozyten wurden jeweils 5 µl APC anti-human CD14 bzw. APC anti-human IgG2b-κ sowie 5 µl 7-AAD zugegeben. Nach der Inkubation wurden alle Proben wieder im Durchflusszytometer vermessen.

Unter Anwendung des Standardprotokolls waren $93,9 \pm 2,2\%$ der isolierten Zellen Monozyten. Ähnliche Reinheitsgrade wurden auch beim 60%-Ansatz ($94,4 \pm 1,8\%$), beim 40%-Ansatz ($94,9 \pm 1,5\%$), beim 10%-Ansatz ($95,4 \pm 3,3\%$) und beim 6%-Ansatz ($95,6 \pm 3,5\%$) erreicht. Wurde die eingesetzte Menge an CD14 Beads noch weiter reduziert, nahm die Reinheit im Vergleich zum Standardprotokoll sogar signifikant zu. So handelte es sich um $96,8 \pm 2,4\%$ aller Zellen um Monozyten, wenn 4% der empfohlenen Beads-Konzentration zur Anwendung kam ($p=0,04$ gegenüber dem Standardprotokoll). Eine noch höhere Reinheit von $97,7 \pm 2,2\%$ konnte erzielt werden, wenn man nur noch 1% der vom Hersteller vorgegebenen Menge an Micro Beads zugab ($p=0,012$ gegenüber dem Standardprotokoll) (Abbildung 6).

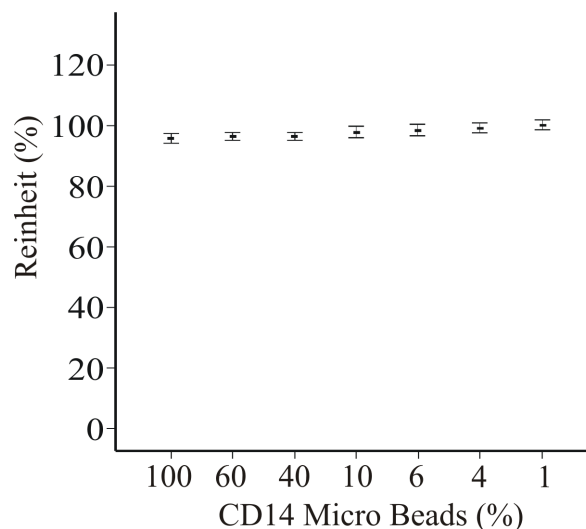


Abbildung 6: Die Reinheiten der isolierten Monozyten bei verschiedenen Mengen an eingesetzten CD14 Micro Beads sind in % angegeben.

3.1.5 Anzahl an CD14⁺- und CD14⁺⁺-Monozyten

Wie im vorherigen Abschnitt bereits erwähnt, nahm die Reinheit der Monozyten mit geringer werdender CD14-Beadskonzentration zu. Beim 4%- und beim 1%-Ansatz war die Reinheit sogar signifikant gegenüber derjenigen erhöht, die beim Befolgen des vom Hersteller vorgegebenen Protokolls erzielt werden konnte.

Da Monozyten aus verschiedenen Subpopulationen bestehen, deren CD14 Expression sich signifikant unterscheidet, sollte geklärt werden, ob durch die Reduzierung der CD14 Micro Beads bevorzugt CD14⁺⁺ Zellen isoliert werden.

Wurde gemäß dem Standardprotokoll verfahren, waren $86,5 \pm 5,1\%$ CD14⁺⁺-Monozyten. Ähnliche Werte konnten registriert werden, wenn 60% ($87,5 \pm 3,7\%$ CD14⁺⁺-Monozyten), 40% ($87,8 \pm 4,0\%$ CD14⁺⁺-Monozyten) oder 10% ($90,3 \pm 4,6\%$ CD14⁺⁺-Monozyten) der empfohlenen CD14-Beadskonzentration eingesetzt wurden. Die Anzahl an CD14⁺⁺-Monozyten nahm bei den restlichen Verdünnungen sogar signifikant zu. So betrug sie beim 6%-Ansatz $93,9 \pm 2,1\%$ ($p=0,01$ gegenüber dem Standardprotokoll), beim 4%-Ansatz $94,6 \pm 3,0\%$ ($p=0,01$ gegenüber dem Standardprotokoll) und beim 1%-Ansatz $96,7 \pm 1,9\%$ ($p<0,001$ gegenüber dem Standardprotokoll). Mit abnehmender Menge an verwendeten CD14 Micro Beads nahm die Zahl der CD14⁺-Monozyten analog ab (Abbildung 7).

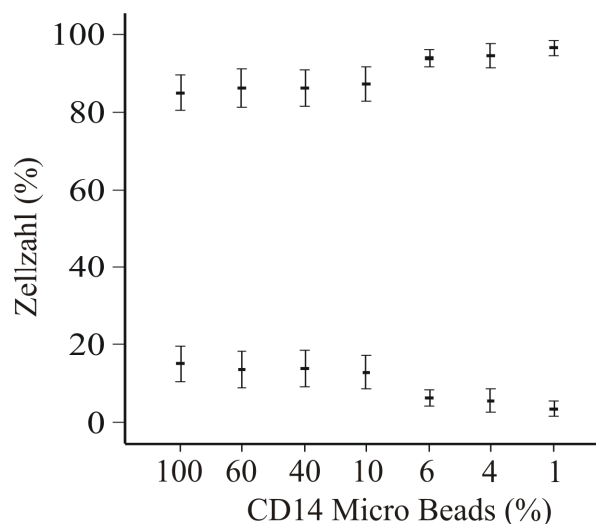


Abbildung 7: Die Zellzahl an CD14⁺⁺- (obere Reihe) und CD14⁺-Monozyten (untere Reihe) ist relativ zur Zellzahl bei Anwendung des Standardprotokolls (=100%) angegeben.

Zur Veranschaulichung der Menge des Oberflächenantigens CD14, die von Monozyten exprimiert wird, sollen folgende repräsentative Abbildungen dienen (Abbildung 8).

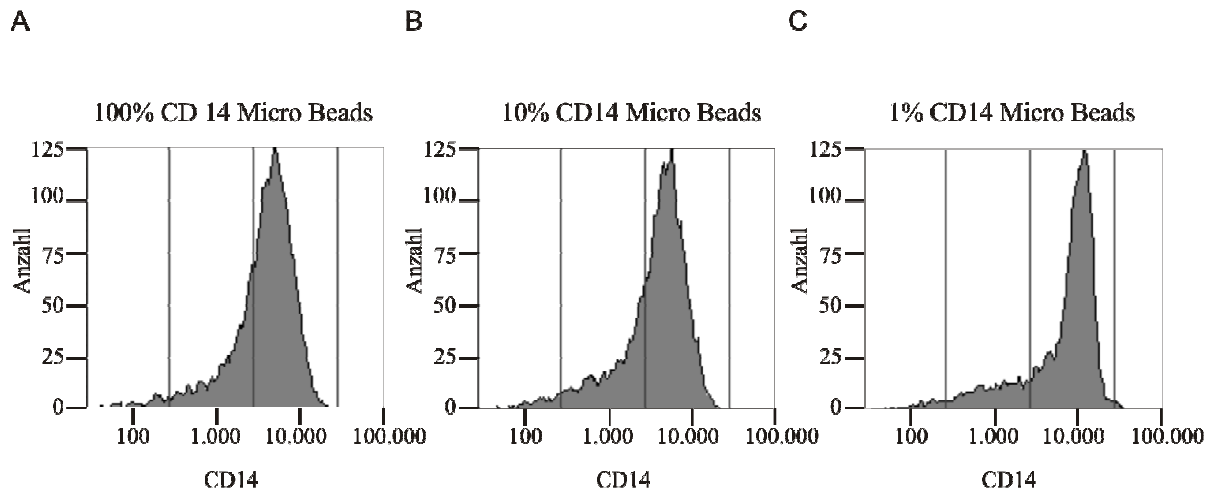


Abbildung 8: CD14 in Monozyten, die mit 100% (A), 10% (B) und 1% (C) der vom Hersteller empfohlenen Menge an CD14-Beads isoliert wurden.

3.1.6 Festlegen der optimalen CD14-Beadskonzentration

Unter Berücksichtigung der oben genannten Ergebnisse wurden bei den folgenden Versuchen 10% der vom Hersteller empfohlenen Menge an CD14 Micro Beads eingesetzt. Mit diesem Ansatz wurde einerseits eine vergleichbar hohe Reinheit, ein ähnliches Verhältnis der CD14-Subpopulationen sowie eine annähernd identische Menge an Monozyten wie bei Befolgung des Herstellerprotokolls erreicht. Zudem konnten bei einer solchen Versuchsanordnung massiv Kosten eingespart werden.

3.2 In vitro Untersuchungen zur Regulation von Annexin A6 in Monozyten

3.2.1 Einfluss von rekombinantem Adiponektin auf die Annexin A6-Proteinexpression in peripheren humanen Monozyten

Von drei gesunden normalgewichtigen Spendern wurden Monozyten aus Vollblut isoliert. Die Monozyten wurden auf 6-Loch Platten ausgesät und für 24 h mit 10 µg/ml rekombinantem Adiponektin inkubiert. Anschließend konnten die Proteine aus dem Zelllysate gewonnen und für Western-Blot-Analysen verwendet werden (Abbildung 9).

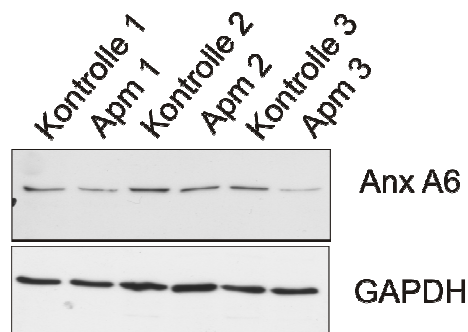


Abbildung 9: Monozyten dreier Spender wurden mit 10 µg/ml rekombinantem Adiponektin für 24 h inkubiert und Annexin A6 und GAPDH detektiert.

Eine Quantifizierung der Western-Blots ergab, dass Adiponektin Annexin A6 im Vergleich zu den kontroll-inkubierten Zellen (100%) signifikant reduzierte ($79,0 \pm 10,2\%$, $p=0,012$).

3.2.2 Dosisabhängige Veränderung der Annexin A6-Proteinexpression

Um herauszufinden, welche Konzentrationen von Adiponektin einen Effekt auf Annexin A6 zeigen, wurden Monozyten aus dem Vollblut dreier verschiedener Spender isoliert und mit 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 7,5 µg/ml und 10 µg/ml Adiponektin für 24 h inkubiert. Annexin A6 nahm dabei ab einer Konzentration von 5 µg/ml signifikant ab, wohingegen bei einer Konzentration von 2,5 µg/ml noch keine Auswirkungen sichtbar waren (Abbildung 10). Durch die höheren Konzentrationen von Adiponektin (7,5 µg/ml und 10 µg/ml) konnte der Effekt jedoch nicht weiter verstärkt werden.

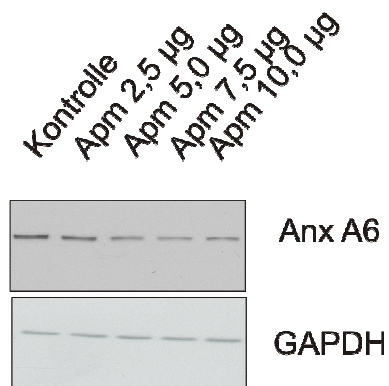


Abbildung 10: Monozyten wurden für 24 h mit rekombinantem Adiponektin unterschiedlicher Konzentrationen (2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 7,5 µg/ml und 10 µg/ml) inkubiert.

3.2.3 Zeitabhängige Veränderung der Annexin A6-Proteinexpression

Im nächsten Schritt sollte aufgezeigt werden, inwiefern die Inkubationszeit mit der Abnahme an exprimiertem Annexin A6 korreliert. Hierzu wurden die Monozyten zweier Spender mit 10 µg/ml rekombinantem Adiponektin für 12 h, 18 h, 24 h und 30 h inkubiert.

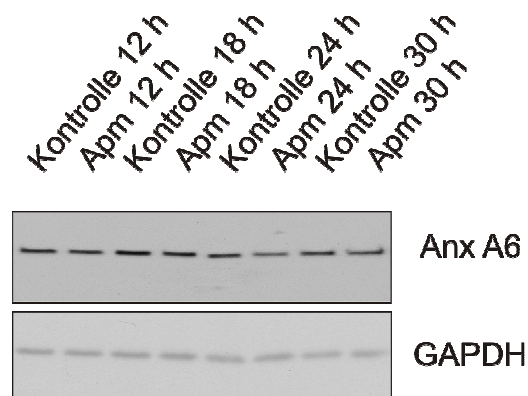


Abbildung 11: Die Monozyten wurden mit 10 µg/ml Adiponektin inkubiert und die Veränderung der Annexin A6-Expression nach 12 h, 18 h, 24 h und 30 h ermittelt.

Wie in Abbildung 11 ersichtlich, ist eine Verminderung des intrazellulären Annexin A6-Gehalts in den Monozyten festzustellen, die für 24 h und für 30 h mit Adiponektin inkubiert wurden. Kürzere Inkubationsphasen hatten hingegen keine Auswirkung.

3.2.4 Rolle der p38 MAP-Kinase in der adiponektinvermittelten Reduzierung von Annexin A6

Da Adiponektin die p38 MAP-Kinase aktiviert, sollte untersucht werden, ob eine Blockade dieser Kinase die verminderte Expression von Annexin A6 durch Adiponektin verhindert.

Hierzu wurden Monozyten für 24 h mit 10 µg/ml rekombinatem Adiponektin, mit 100 nM des p38 MAPK-Inhibitors SB 203580 sowie mit rekombinatem Adiponektin und SB 203580 zusammen inkubiert (Abbildung 12).

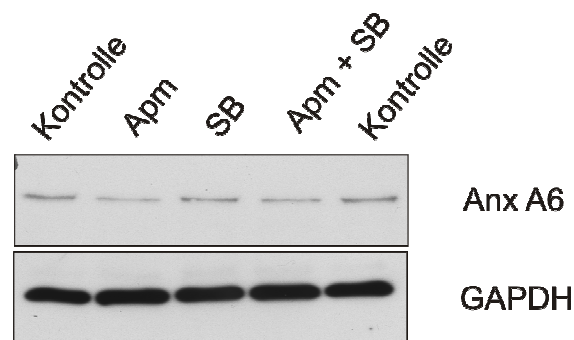


Abbildung 12: Die Monozyten wurden für 24 h mit rekombinatem Adiponektin, mit dem p38 MAPK-Inhibitor SB 203580 allein oder mit Adiponektin zusammen mit SB 203580 inkubiert.

Im Vergleich zur Kontrolle ist ersichtlich, dass eine Inkubation mit Adiponektin alleine zu einer Verminderung in der Expression von Annexin A6 führte. Die Stimulation mit SB 203580 hingegen zeigte keine Veränderung. Überdies wurde die Proteinexpression der Monozyten durch Zugabe von Adiponektin zusammen mit SB 203580 auf die gleiche Weise vermindert, wie ohne Beifügung des Inhibitors.

3.2.5 Bedeutung von PPAR α in der adiponektinvermittelten Reduktion von Annexin A6

Adiponektin führt zu einer Aktivierung von PPAR α . Es sollte deshalb durch Zugabe von Fenofibrat, einem PPAR α -Agonisten bzw. durch Inkubation mit dem PPAR α -Inhibitor RU486 geprüft werden, ob die geringere Expression von monozytärem Annexin A6 durch eine Aktivierung von PPAR α bewirkt wird.

Es wurden hierzu Monozyten mit 10 μ g/ml rekombinantes Adiponektin sowie mit 10 μ g/ml rekombinantes Adiponektin zusammen mit 5 μ M RU486 für 24 h inkubiert.

Es ist ersichtlich, dass durch Stimulation mit Adiponektin die Menge an Annexin A6 reduziert ist, die Zugabe von RU486 jedoch nicht inhibitorisch auf den von Adiponektin vermittelten Effekt wirkt (Abbildung 13).

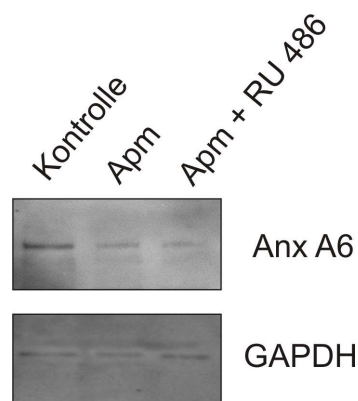


Abbildung 13: Monozyten wurden für 24 h mit 10 μ g/ml rekombinantes Adiponektin sowie mit 10 μ g/ml rekombinantes Adiponektin zusammen mit 5 μ M RU486 inkubiert.

Auch die Inkubation mit Fenofibrat (0,5 μ M und 1 μ M für 24 h) konnte diesen Mechanismus nicht bestätigen (Abbildung 14).

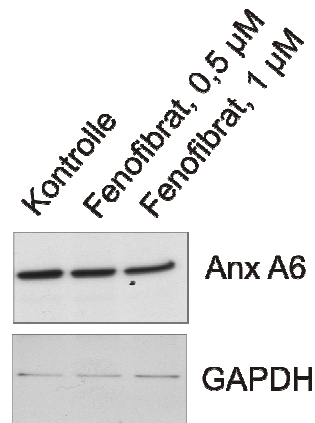


Abbildung 14: Die Monozyten wurden für 24 h mit 0,5 µM und 1 µM Fenofibrat inkubiert und Annexin A6 im Immunoblot nachgewiesen.

3.2.6 Einfluss von Lovastatin und Methyl-β-Cyclodextrin auf die Proteinexpression von Annexin A6

Da Adiponektin die Cholesterinmenge in Monozyten vermindert, wurde nachgeprüft, ob ein Zusammenhang zwischen der Cholesterinkonzentration der Monozyten und der Proteinexpression von Annexin A6 besteht.

Dazu wurden Monozyten mit 5 µM Lovastatin (hemmt die HMG-CoA-Reduktase) bzw. mit 1 mg/ml Methyl-β-Cyclodextrin (entfernt Cholesterin aus der Zellmembran) inkubiert. Nach 16 h zeigte sich aber weder bei einer Behandlung mit Lovastatin noch mit Methyl-β-Cyclodextrin eine Veränderung in der Expression von Annexin A6 (Abbildung 15).

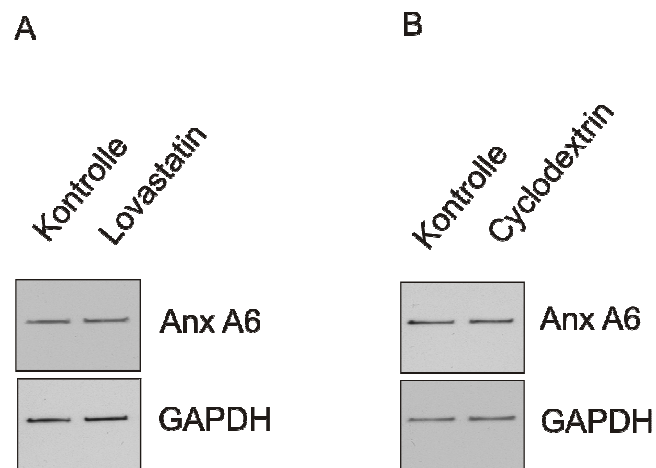


Abbildung 15: Die Monozyten wurden aus Vollblut isoliert und für 16 h mit 5 μ M Lovastatin (A) bzw. mit 1 mg/ml Methyl- β -Cyclodextrin (B) inkubiert.

3.2.7 Veränderung der intrazellulären Menge an Annexin A6 durch Metformin

Um abzuklären, ob der Einfluss von Adiponektin auf die Proteinexpression durch die AMP aktivierte Proteinkinase vermittelt wird, wurde den Monozyten von drei verschiedenen Spendern Metformin in den Konzentrationen 100 μ M und 500 μ M zugegeben und die Zellen anschließend für 24 h inkubiert. Wie in Abbildung 16 beispielhaft gezeigt, lässt sich keine Veränderung von Annexin A6 durch Zugabe von 100 μ M und 500 μ M Metformin nachweisen.

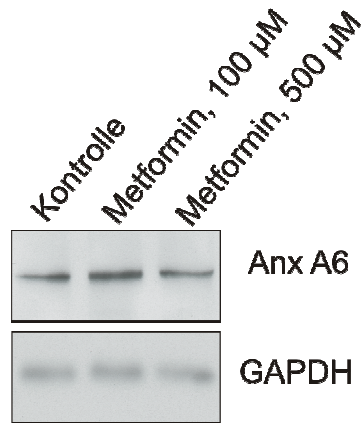


Abbildung 16: Annexin A6 in Monozyten, die für 24 h mit 100 µM und 500 µM Metformin inkubiert wurden.

3.2.8 Effekt von AICAR auf monozytäres Annexin A6

Auch durch die Inkubation mit einem weiteren AMPK-Aktivator, AICAR, in einer Konzentration von 2 mM, konnte keine Veränderung in der Proteinexpression von Annexin A6 nachgewiesen werden (Abbildung 17).

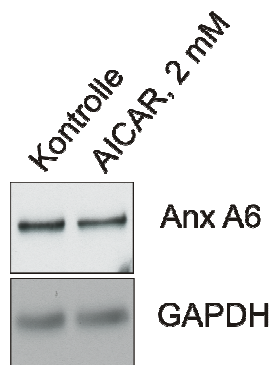


Abbildung 17: Annexin A6 in Monozyten, die für 24 h mit 2 mM AICAR inkubiert wurden.

3.2.9 Veränderung der Annexin A6-Proteinexpression durch 9-cis-Retinsäure und 25-Hydroxycholesterin

Um herausfinden zu können, ob die verminderte Menge an monozytärem Annexin A6 über eine Aktivierung des Retinoid-X-Rezeptor (RXR) oder über den Leber-X-Rezeptor (LXR) vermittelt wird, wurden den Monozyten die Agonisten für diese Rezeptoren zugegeben.

9-cis-Retinsäure (9-cRA, hier 10 μM) ist dabei ein Ligand von RXR, 25-Hydroxycholesterin (25-OH, hier 10 $\mu\text{g/ml}$) dient als Ligand von LXR.

Nach einer Inkubationszeit von 24 h konnte allerdings kein Effekt nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 18).

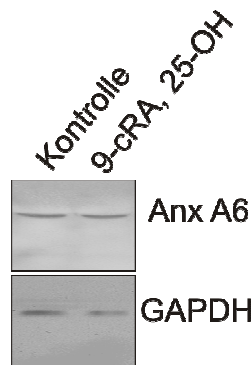


Abbildung 18: Die Monozyten wurden für 24 h mit 10 μM 9-cis-Retinsäure und 10 $\mu\text{g/ml}$ 25-Hydroxycholesterin inkubiert.

Überdies wurden von zwei verschiedenen Spendern Monozyten isoliert und diese ebenfalls für 24 h mit 10 μM 9-cis-Retinsäure und 10 $\mu\text{g/ml}$ 25-Hydroxycholesterin inkubiert. Anschließend wurde im LightCycler® die Veränderung der Annexin A6 mRNA gemessen.

Hier zeigte sich, dass in diesen Monozyten durch die Inkubation mit 9-cRA und 25-OH die doppelte Menge an Annexin A6 mRNA vorhanden war.

Über eine statistische Signifikanz kann jedoch aufgrund der zu geringen Zahl an Spendern keine Aussage getroffen werden.

3.2.10 Einfluss von LPS auf monozytäres Annexin A6

Auch die Zugabe von 1 ng/ml LPS, welches NF- κ B aktiviert, zeigte nach 24 h keine Veränderung in der monozytären Expression von Annexin A6 (Abbildung 19).

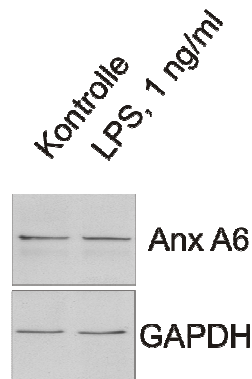


Abbildung 19: Monozyten wurden für 24 h mit 1 ng/ml LPS inkubiert und Annexin A6 mit Immunoblot detektiert.

3.2.11 Effekt von Pioglitazon auf monozytäres Annexin A6

PPAR γ ist ein essentieller nukleärer Rezeptor in Monozyten, weswegen durch Zugabe des Insulin-Sensitizers Pioglitazon, der an diesem Rezeptor wirkt, untersucht werden sollte, ob eine PPAR γ -Aktivierung Annexin A6 beeinflusst.

Hierzu wurde zu den isolierten Monozyten 12,5 μ M Pioglitazon (PG) gegeben und diese für 24 h inkubiert. Im Western-Blot ließ sich allerdings keine Veränderung von Annexin A6 feststellen (Abbildung 20).

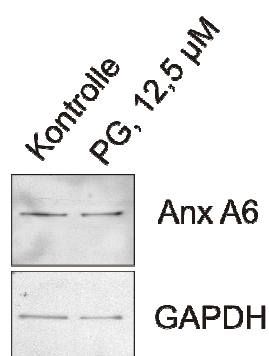


Abbildung 20: Die isolierten Monozyten wurden für 24 h mit 12,5 μ M Pioglitazon (PG) stimuliert.

3.2.12 Veränderung des monozytären Annexin A6-Gehalts durch die Fettsäuren Palmitinsäure und Ölsäure

Da bei übergewichtigen Personen eine höhere Menge an freien Fettsäuren im Serum nachweisbar ist, wurde untersucht, ob erhöhte Fettsäurekonzentrationen die Expression von Annexin A6 beeinflussen. Hierzu wurde den Monozyten 100 μM , 200 μM und 300 μM Palmitinsäure (PA) bzw. 100 μM , 200 μM und 300 μM Ölsäure (OA) zugegeben und für 24 h inkubiert. Steigende Fettsäurekonzentrationen haben allerdings keinen Einfluss auf die Proteinexpression von Annexin A6 (Abbildung 21).

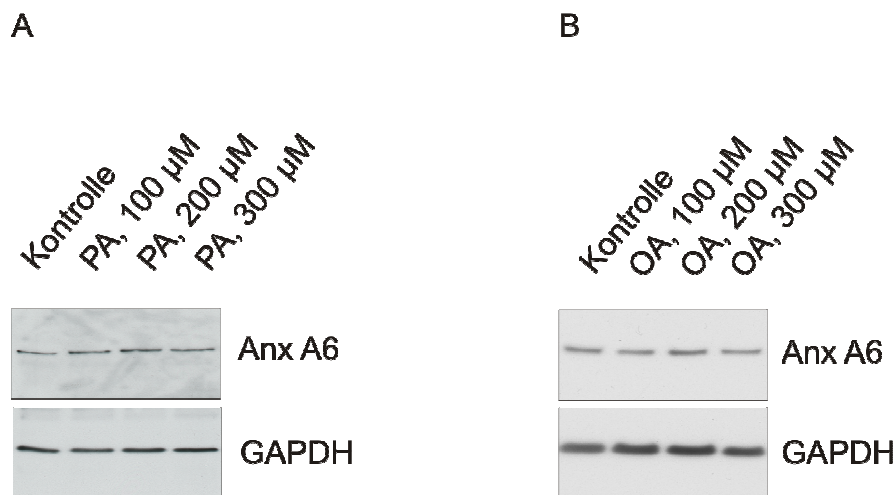


Abbildung 21: Den Monozyten wurde 100 μM , 200 μM und 300 μM Palmitinsäure (A) bzw. 100 μM , 200 μM und 300 μM Ölsäure (B) zugegeben und für 24 h inkubiert.

3.2.13 Auswirkung der Inkubation mit IL-6 und IL-8 auf den intrazellulären Gehalt an Annexin A6

Da Adiponektin die Expression von IL-6 und IL-8 induziert, sollte geprüft werden, ob eine Stimulation der Monozyten mit 20 ng/ml IL-6 bzw. 100 ng/ml, 200 ng/ml und 300 ng/ml IL-8 für 24 h die Expression von Annexin A6 beeinflusst.

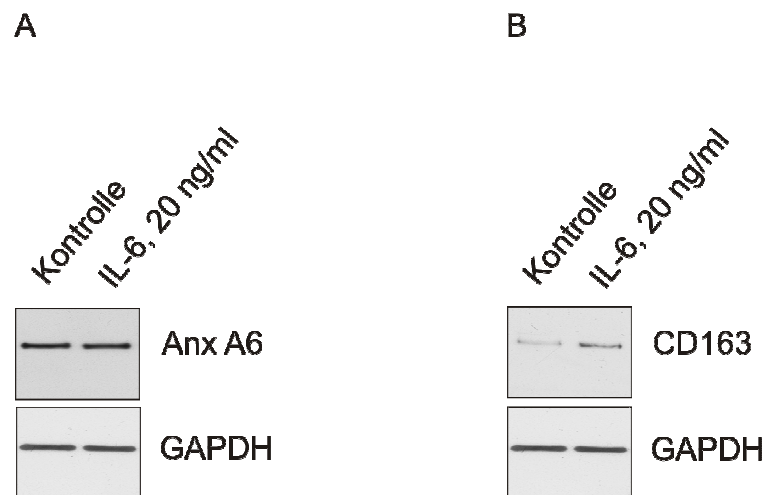


Abbildung 22: Die Monozyten wurden für 24 h mit 20 ng/ml IL-6 inkubiert. Als primäre Antikörper wurden Anti-Annexin A6 (A) bzw. Anti-CD163 (B) verwendet.

In Abbildung 22 (A) zeigt sich keine Veränderung des intrazellulären Gehalts an Annexin A6 durch IL-6. Zur Kontrolle der erfolgreichen Inkubation ist in Abbildung 22 (B) die bereits in der Literatur beschriebene verstärkte Expression von CD163 durch Stimulation mit IL-6 gezeigt [87].

Überdies bewirkte eine Inkubation mit IL-8 (100 ng/ml, 200 ng/ml und 300 ng/ml) für 24 h keine Veränderung von Annexin A6 (Abbildung 23).

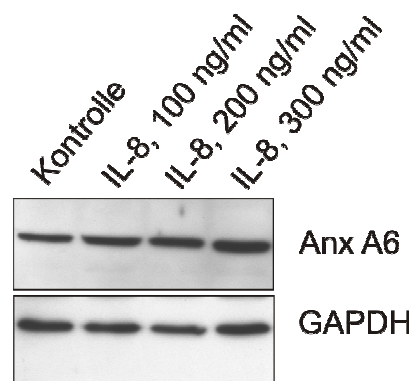


Abbildung 23: Stimulation der Monozyten mit 100 ng/ml, 200 ng/ml und 300 ng/ml IL-8 für 24 h und Nachweis von Annexin A6.

3.2.14 Effekt von rekombinantem Adiponektin auf die Annexin A6 mRNA Expression

Es wurden von 5 verschiedenen Spendern Monozyten isoliert und für 24 h mit 10 µg/ml rekombinantem Adiponektin inkubiert. Anschließend wurde RNA aus den Zellen isoliert und die Veränderung an Annexin A6 mRNA im LightCycler® ermittelt. Es konnte allerdings keine statistisch signifikante Veränderung in der Annexin A6 Genexpression festgestellt werden.

3.3 Annexin A6 in Monozyten von schlanken und übergewichtigen Kontrollen und Typ 2 Diabetikern

Für die folgenden Untersuchungen wurden Monozyten verschiedener Spender (s. Tabelle 3) verwendet, wobei das Spenderkollektiv von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe erstellt worden war.

	Typ 2 Diabetiker	Übergewichtige Kontrollen (WHR > 1)	Normalgewichtige Kontrollen (WHR < 1)
Probanden (n)	n=8	n=7	n=9
Alter (Jahre)	61,9 ± 10,1	63,8 ± 10,3	61,4 ± 8,1
BMI (kg/m²)	32,5 ± 10,6	27,6 ± 3,2	23,8 ± 2,5
WHR	0,99 ± 0,09	1,04 ± 0,03	0,94 ± 0,04
Adiponektin (µg/ml)	1,6 ± 0,7	3,7 ± 2,8	4,1 ± 1,9

Tabelle 3: Anthropometrische und metabolische Charakteristika des Spenderkollektivs. BMI=Body-Mass-Index, WHR=Waist-to-hip ratio

Der BMI ist bei den Typ 2 Diabetikern im Vergleich zu den Normalgewichtigen ($p=0,015$) bzw. bei den Übergewichtigen im Vergleich zu den Normalgewichtigen ($p=0,026$) signifikant erhöht.

Ebenso signifikant liegt die WHR der Typ 2 Diabetiker, verglichen mit den Normalgewichtigen ($p=0,002$) und die WHR der Übergewichtigen, verglichen mit den Normalgewichtigen ($p=0,002$), höher.

Der Adiponektin-Serumspiegel der Typ 2 Diabetiker ist gegenüber den normalgewichtigen Kontrollen signifikant erniedrigt ($p=0,002$).

3.3.1 Annexin A6 in Monozyten von Typ 2 Diabetikern und normalgewichtigen und übergewichtigen Kontrollen

Zelllysate der peripheren Monozyten aus Typ 2 Diabetikern und normalgewichtigen und übergewichtigen Kontrollen wurden mit Western-Blots analysiert (Abbildung 24). Anschließend wurden die Western-Blots quantifiziert.

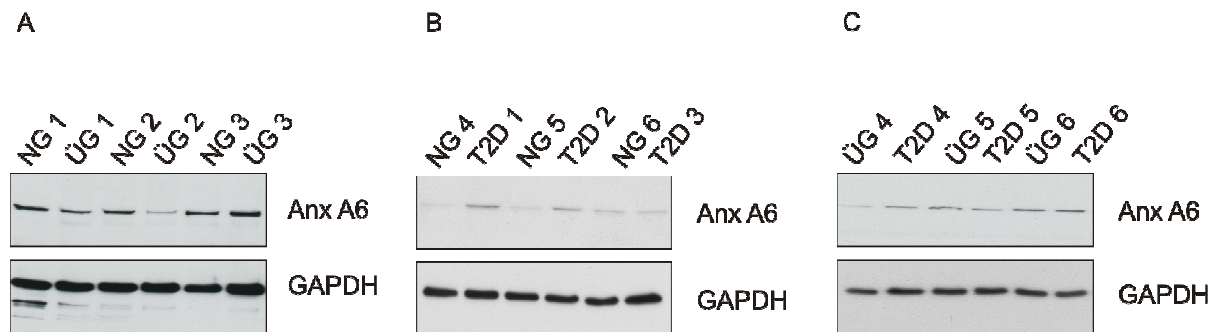


Abbildung 24: (A) Annexin A6 in Monozyten normalgewichtiger (NG 1-3) und übergewichtiger (ÜG 1-3) Spender; (B) Annexin A6 in Monozyten normalgewichtiger Spender (NG 4-6) und Typ 2 Diabetiker (T2D 1-3); (C) Annexin A6 in Monozyten übergewichtiger Spender (ÜG 4-6) und Typ 2 Diabetiker (T2D 4-6)

Es zeigte sich, dass Annexin A6, nach Normalisierung durch die GAPDH-Mengen, in den Monozyten normalgewichtiger Spender eine arbiträre Expression von $0,9 \pm 0,1$ hatte. In den Monozyten Übergewichtiger war sie $1,0 \pm 0,1$ und in den Monozyten der Typ 2 Diabetiker $1,1 \pm 0,2$. Der Gehalt an intrazellulärem Annexin A6 war dabei bei den Übergewichtigen ($p=0,005$) und bei den Typ 2 Diabetikern ($p=0,002$) im Vergleich zu den Monozyten der normalgewichtigen Spender signifikant erhöht (Abbildung 25).

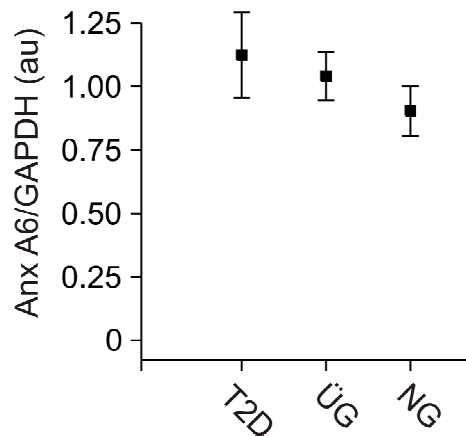


Abbildung 25: Quantifizierung der Western-Blots, die in den Abbildungen 24 (A), (B), und (C) gezeigt sind.

3.3.2 Zusammenhang zwischen der Annexin A6 Proteinexpression, dem BMI und dem Adiponektin-Serumspiegel

Durch die Quantifizierung des Gehalts an monozytärem Annexin A6 konnte gezeigt werden, dass zwischen dem monozytärem Annexin A6 und dem BMI der Spender eine positive Korrelation besteht ($r=0,809$, $p<0,0001$, Abbildung 26).

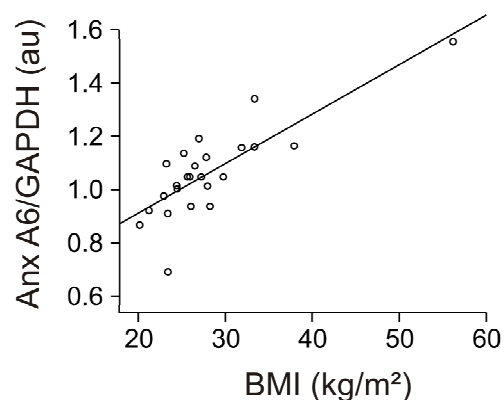


Abbildung 26: Korrelation des intrazellulären Annexin A6 mit dem BMI der entsprechenden Spender.

Zusätzlich wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der monozytären Proteinexpression von Annexin A6 und dem Serumspiegel von Adiponektin besteht.

Es zeigte sich eine negative Korrelation zwischen dem monozytären Annexin A6-Gehalt und der Adiponektin-Konzentration ($r=-0,442$, $p=0,035$, Abbildung 27).

Da Adiponektin negativ mit dem BMI korreliert, wurde eine Korrelation korrigiert für den BMI berechnet. Dies ergab, dass die negative Korrelation von monozytärem Annexin A6 und Adiponektin einzig durch den BMI erklärt ist.

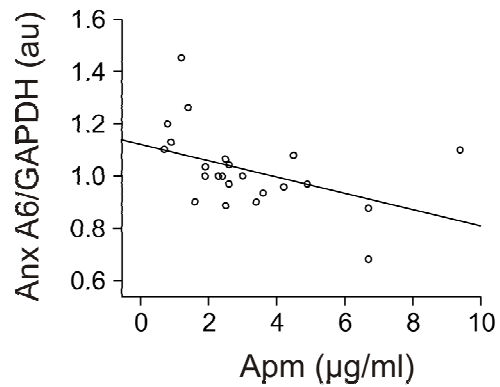


Abbildung 27: Korrelation des monozytären Annexin A6 mit den Adiponektin-Serumspiegeln.

4 Diskussion

4.1 Reinigung von Blutmonozyten mit CD14 Micro Beads

Zur Aufreinigung von Monozyten aus Vollblut stehen verschiedene Techniken zur Verfügung. Zum Einen ist es möglich, durch Leukapherese und anschließende Zentrifugation eine große Anzahl von Monozyten mit einer hohen Reinheit zu isolieren [88]. Dieses Verfahren stellt sich allerdings als sehr aufwändig dar, wenn von verschiedenen Spendern Zellen isoliert werden sollen. Zum Anderen kann die Eigenschaft der Monozyten ausgenutzt werden, dass sie an Kunststoffoberflächen adhären und so eine Auftrennung der Blutzellen erreicht wird [89]. Allerdings wird bei diesem Vorgehen die Zellmorphologie verändert sowie eine unerwünschte Aktivierung der Monozyten bewirkt, wodurch die Messergebnisse der folgenden Versuchsreihen verfälscht werden können [89].

Eine weitere etablierte Methode, die leicht und reproduzierbar durchführbar ist, stellt die Isolierung von Monozyten unter Anlegen eines Magnetfeldes dar. Die Zellen müssen hierzu zunächst mit CD14 Micro Beads inkubiert werden, bevor sie von den restlichen mononukleären Zellen magnetisch separiert werden können [90]. Allerdings sind die CD14 Micro Beads relativ teuer, sodass untersucht wurde, inwiefern sich die Verwendung einer geringeren Menge an CD14 Micro Beads als diejenige, die im Herstellerprotokoll empfohlen wird, auf die Population der isolierten Monozyten auswirkt.

Es konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, die Herstellerangabe der Beads-Konzentration weit zu unterschreiten. Eine 10-fach geringere Menge an CD14 Micro Beads liefert genauso viele Monozyten wie das Standardprotokoll. Die isolierten Monozyten hatten dabei eine gleichermaßen hohe Reinheit und zeigten eine ähnliche Verteilung der CD14 Expression wie unter Verwendung des Herstellerprotokolls. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden in allen folgenden Versuchsanordnungen die Monozyten unter Anwendung dieser geringeren Beads-Konzentration isoliert.

4.2 Funktionelle Betrachtung des Membranproteins Annexin A6

4.2.1 Zusammenfassung wichtiger Annexin A6-Funktionen

Wie bereits erwähnt, tritt Annexin A6 in Wechselwirkung mit Zellmembranen und ist dadurch u. a. an der Exozytose, an der Endozytose sowie an Apoptosevorgängen beteiligt und interagiert darüber hinaus mit Proteinen des Zytoskeletts [91]. Einige wesentliche Funktionen dieses Membranproteins sollen im Folgenden näher erläutert werden.

Ein bedeutender Signalweg, der die Proliferation und die Differenzierung von Zellen beeinflusst sowie an der Entstehung von Krebserkrankungen beteiligt ist, ist der Ras-Raf-MAPK-Signalweg [79]. Ein Mechanismus, der von eukaryontischen Zellen zur Weiterleitung eines extrazellulären Signals verwendet wird, ist die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration. Die Interaktion von Annexin A6 mit p120GAP, einem GTPase-aktivierenden Protein und die anschließende Translokation dieses Komplexes zur Plasmamembran wird durch Veränderungen in der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration reguliert [79]. GTPase aktivierende Proteine (GAPs) stellen wichtige Proteine in der Steuerung der Ras-Aktivität dar, da sie Ras inaktivieren können. Eine verminderte Ras-Inaktivierung, oftmals bedingt durch Mutationen, wird mit der Entstehung von Tumoren in Verbindung gebracht, wobei die Ras-Inaktivierung in mehr als 20% der menschlichen Krebsarten gestört ist [79].

Darüber hinaus wird eine Rolle von Annexin A6 in der Herzaktivität, vor allem in der Verteilung und Homöostase von Ca^{2+} in den Kardiomyozyten, diskutiert [91]. Es kann in hohen Mengen in Kardiomyozyten nachgewiesen werden, wobei es das am meisten exprimierte Annexin im Myokard darstellt [91]. In Studien mit Meerschweinchen, die an einem Herzfehler erkrankten, war Annexin A6 erhöht [92], wohingegen es in geschädigten menschlichen Herzen um 46% reduziert war [93]. Die Ergebnisse von Untersuchungen mit Annexin A6 Knockout-Mäusen bzw. mit Mäusen, die Annexin A6 überexprimieren, deuten darauf hin, dass Annexin A6 eine negativ inotrope Wirkung auf die Zellen des Myokards ausübt [91].

De Diego et al. zeigten einen Einfluss von Cholesterin auf die intrazelluläre Verteilung von Annexin A6 auf [83]. So bewirkte die Verminderung des zellulären Cholesterins eine verringerte Ca^{2+} -unabhängige Bindung von Annexin A6 an die Membran früher und später Endosomen. Im Gegenzug konnte durch erhöhte Cholesterinspiegel die Bindung von Annexin A6 an diese Membranen gesteigert

werden. Cubells et al. konnten schließlich nachweisen, dass in Zellen, die sehr große Mengen an Annexin A6 exprimieren, die intrazelluläre Verteilung von Cholesterin gestört ist, was zu einem verminderten Vorkommen von Cholesterin in der Plasmamembran führt. Dadurch war auch die Ausschleusung von Cholesterin und u. a. dessen Transfer auf HDL Partikel, die normalerweise für den Abtransport von Cholesterin aus peripheren Zellen verantwortlich sind, verringert [94].

Grewal et al. konnten beweisen, dass Annexin A6 bei der rezeptorvermittelten Endozytose und dem Transport von LDL in das prälysosomale Kompartiment beteiligt ist [95]. In ihren Untersuchungen verwendeten sie Chinese Hamster Ovary (CHO) Zellen, die Annexin A6 überexprimierten und fanden heraus, dass eine gleichzeitige Überexpression von Annexin A6 und des LDL-Rezeptors zu einer signifikant erhöhten Aufnahme von LDL in die Zellen führte. Die alleinige Überexpression von Annexin A6 bewirkte jedoch keine Veränderung. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass Annexin A6 an der rezeptorvermittelten Endozytose beteiligt ist und während des Endozytosevorgangs den Transport der Liganden in das prälysosomale Kompartiment steuert [95].

Darüber hinaus scheint eine Beteiligung von Annexin A6 an der Transformation von Makrophagen in Schaumzellen und somit an der Entstehung von arteriosklerotischen Gefäßschädigungen möglich, wie im Folgenden diskutiert werden soll.

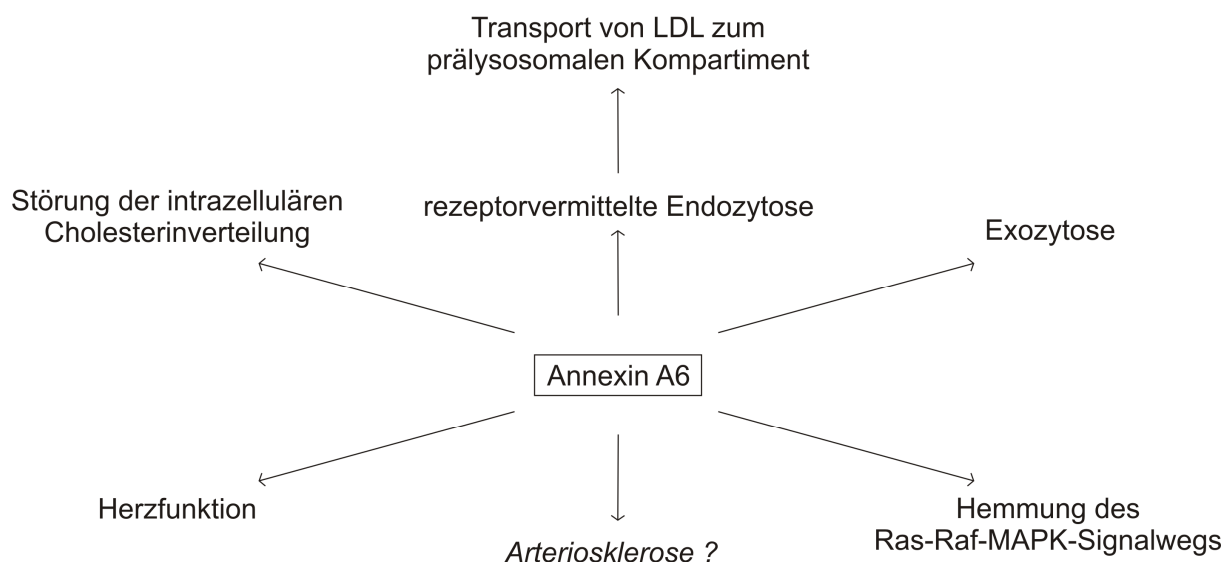


Abbildung 28: Zusammenfassung der wichtigsten bekannten Funktionen von Annexin A6.

In Abbildung 28 sind die wichtigsten bekannten Funktionen von Annexin A6 zusammenfassend dargestellt [91, 94, 95].

4.2.2 Mögliche Beteiligung von Annexin A6 an der Entstehung von Arteriosklerose

Im reversen Cholesterintransport spielen die beiden Transporter ABCA1 und ABCG1 eine wesentliche Rolle in der Ausschleusung von Cholesterin aus peripheren Zellen. Obwohl durch die Medikamente Fenofibrat und Pioglitazon die Expression von ABCA1 bzw. ABCG1 gesteigert werden kann [107], führte eine Inkubation der peripheren humanen Monozyten mit diesen Substanzen nicht zu einer geänderten Expression von Annexin A6, was darauf hindeutet, dass Annexin A6 nicht durch die Menge an ABCA1 bzw. ABCG1 beeinflusst wird.

Cubells et al. konnten zeigen, dass in Chinese Hamster Ovary (CHO) Zellen, die Annexin A6 überexprimieren, die Cholesterinausschleusung gestört ist (s. oben, [94]). Auch die erhöhten Annexin A6-Mengen, welche in den Monozyten von Typ 2 Diabetikern vorgefunden wurden, könnten den reversen Cholesterintransport behindern [52, 108]. Adiponektin hingegen erhöht den reversen Cholesterintransport durch Erhöhung von ABC-Transportern [76, 77] und reduziert monozytäres Annexin A6. Dadurch wird der reverse Cholesterintransport aus Monozyten gefördert und die Umwandlung von Monozyten in Schaumzellen möglicherweise verhindert. Dieser Mechanismus könnte somit in der Pathogenese der Arteriosklerose eine wesentliche Rolle spielen, wobei auf diese Weise ein möglicher arterioprotektiver Effekt von Adiponektin erklärt werden kann.

4.3 Zusammenhang zwischen der Adiponektin-Plasmakonzentration, dem BMI und der monozytären Annexin A6-Expression in vivo

Es wurde gezeigt, dass unter dem Einfluss des antidiabetischen, antiinflammatorischen und arterioprotektiven Adipokins Adiponektin die Expression von Annexin A6 in peripheren humanen Monozyten *in vitro* reduziert ist. Damit übereinstimmend ist in Monozyten von Typ 2 Diabetikern, mit, gegenüber den

normalgewichtigen Kontrollen, reduziertem systemischem Adiponektin, die Menge an exprimiertem Annexin A6 erhöht. Darüber hinaus konnte eine positive Korrelation zwischen dem BMI der untersuchten Probanden und der monozytären Annexin A6-Menge festgestellt werden, wobei mit zunehmendem Körpergewicht die Menge an exprimiertem Annexin A6 erhöht war. Dieser Anstieg scheint jedoch nicht mit der Adiponektin-Plasmakonzentration dieser Probanden in Zusammenhang zu stehen. Zunächst lag eine negative Korrelation zwischen dem Gehalt an Annexin A6 in den Monozyten und dem Adiponektin-Spiegel vor. Wurde allerdings für diese Berechnung zusätzlich der BMI der jeweiligen Spender berücksichtigt, so konnte keine Korrelation mehr nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass lediglich der BMI eine Aussage über die Annexin A6-Expression zulässt und die Veränderung in der Annexin A6-Expression bei Übergewichtigen durch andere Faktoren als durch eine geringere Adiponektin-Plasmakonzentration verursacht wird. Dementsprechend muss beachtet werden, dass bereits bei den übergewichtigen Probanden eine größere Menge an Annexin A6 vorhanden war, obwohl deren Adiponektin-Spiegel nicht signifikant von denen der normalgewichtigen Kontrollen abwich.

4.4 Untersuchung des Mechanismus, der zu einer verminderten Expression von Annexin A6 in Monozyten führt

4.4.1 Auswirkungen von IL-6, IL-8, freien Fettsäuren und LPS auf Annexin A6 in Monozyten in vitro

Bei übergewichtigen Menschen sind die Plasmakonzentrationen von IL-6, IL-8, freien Fettsäuren und LPS signifikant gegenüber denen von normalgewichtigen Spendern erhöht [62, 96-98]. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch keinerlei Effekt durch die Stimulation der Monozyten mit IL-6, IL-8, freien Fettsäuren (Palmitinsäure und Ölsäure) oder LPS auf Annexin A6 nachgewiesen werden. Daher ist bislang unklar, welche Mediatoren zu einer erhöhten Annexin A6-Expression in den Monozyten von Übergewichtigen bzw. Typ 2 Diabetikern führen.

4.4.2 Einfluss der AMPK auf die Annexin A6-Expression in vitro

Die verminderte Menge an Annexin A6 in Monozyten, die *in vitro* durch Stimulation mit Adiponektin vorgefunden wurde, könnte durch eine Aktivierung der AMPK durch Adiponektin vermittelt werden [99]. Die aktivierte AMPK führt u. a. zu einer Hemmung der Cholesterinsynthese und senkt dadurch den Cholesterinspiegel in der Zelle [100, 101].

Durch Stimulation mit Metformin, das oft zur medikamentösen Therapie bei Typ 2 Diabetes mellitus Patienten verwendet wird und das ebenfalls eine Aktivierung der AMPK sowie eine Verminderung des Cholesteringehalts bewirkt [99], konnte jedoch keine Veränderung in der Menge des monozytären Annexin A6 ermittelt werden.

4.4.3 Effekt von PPAR α auf monozytäres Annexin A6 in vitro

Adiponektin führt zu einer Aktivierung von PPAR α [102], weswegen zunächst vermutet wurde, dass die Verminderung in der Expression von Annexin A6 in Monozyten unter dem Einfluss von Adiponektin über diesen Signalweg abläuft. Durch Zugabe von RU486, einem Inhibitor von PPAR α [103], konnte jedoch die Wirkung von Adiponektin auf Annexin A6 nicht ausgeschaltet werden, weshalb dieser Mechanismus ebenfalls ausgeschlossen wurde.

4.4.4 Rolle der p38 MAP-Kinase in der Regulation von Annexin A6

Adiponektin bewirkt eine Aktivierung der p38 MAP-Kinase [104]. Es wurde deshalb getestet, ob die Inkubation der Monozyten mit dem MAPK-Inhibitor SB 203580 eine Auswirkung auf monozytäres Annexin A6 hat. Ein solcher Einfluss konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

4.4.5 Auswirkung des Cholesteringehalts auf die Annexin A6-Expression von Monozyten in vitro

Lovastatin bewirkt eine Hemmung der HMG-CoA-Reduktase [105], Methyl- β -Cyclodextrin hingegen reduziert die Menge an Cholesterin, die in der Zellmembran vorhanden ist [106]. Allerdings konnte auch durch Stimulation mit diesen Pharmazeutika keine Veränderung des monozytären Annexin A6-Gehalts bewirkt werden.

Darüber hinaus konnten mehrere Arbeitsgruppen nachweisen, dass eine vermehrte Cholesterinaufnahme in Monozyten ebenfalls keine Änderung in der Menge des exprimierten Annexin A6 verursacht [82, 83, 94, 95].

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst die CD14 Micro Beads titriert und so die Menge an CD14 Micro Beads bestimmt, die nötig ist, um eine große Anzahl Monozyten mit einem hohen Reinheitsgrad, verbunden mit geringen Kosten, aus Vollblut isolieren zu können.

In den folgenden *in vitro* Untersuchungen wurden dann periphere Monozyten von humanen Spendern isoliert, um die dosis- und zeitabhängige Veränderung der Annexin A6-Proteinexpression unter dem Einfluss von Adiponektin feststellen zu können. Anschließend sollte untersucht werden, über welchen Signalweg Adiponektin die verminderte Menge an Annexin A6 in Monozyten bewirkt. Der genaue Mechanismus hierzu konnte allerdings nicht aufgeklärt werden. Es gibt jedoch Anzeichen, dass Annexin A6 eng mit dem Cholesterinstoffwechsel zusammenhängt, den reversen Cholesterintransport stört und somit eine Rolle in der Entstehung von Arteriosklerose spielen könnte.

Zusätzlich wurde in *ex vivo* Untersuchungen eine Korrelation zwischen dem BMI, den jeweiligen Adiponektin-Plasmakonzentrationen und dem monozytären Annexin A6 von Typ 2 Diabetikern sowie übergewichtigen und normalgewichtigen Kontrollgruppen nachgewiesen. Jedoch bleibt immer noch unklar, durch welchen Mechanismus Annexin A6 in den Monozyten Übergewichtiger vermehrt exprimiert wird.

Es sind somit noch weitere Untersuchungen notwendig, in denen geklärt werden muss, durch welchen Mechanismus Adiponektin die Annexin A6-Expression reguliert. Annexin A6 ist also in den Monozyten von übergewichtigen Spendern erhöht und könnte über eine Verminderung des reversen Cholesterintransports zur Schaumzelltransformation beitragen.

6 Publikationen

6.1 Erstautorenschaften

F. Stögbauer, M. Neumeier, J. Weigert, J. Wanninger, M. Grandl, K. Lehle, G. Schmitz, C. Aslanidis, A. Schäffler, J. Schölmerich, C. Buechler, Highly efficient and low-cost method to isolate human blood monocytes with high purity, *J Immunol Methods* 337(1) (2008) 78-80

F. Stögbauer, J. Weigert, M. Neumeier, J. Wanninger, D. Sporrer, M. Weber, A. Schäffler, C. Enrich, P. Wood, T. Grewal, C. Aslanidis, C. Buechler, Annexin A6 is highly abundant in monocytes of obese and type 2 diabetic individuals and is downregulated by adiponectin in vitro, *Exp Mol Med* 41(7) (2009) 501-7

6.2 Koautorenschaften

J. Weigert, M. Neumeier, J. Wanninger, F. Schober, D. Sporrer, M. Weber, A. Schram, S. Wurm, **F. Stögbauer**, M. Filarsky, A. Schäffler, C. Aslanidis, J. Schölmerich, C. Buechler, Adiponectin upregulates monocytic activin A but systemic levels are not altered in obesity or type 2 diabetes, *Cytokine* 45(2) (2009) 86-91

D. Sporrer, M. Weber, J. Wanninger, J. Weigert, M. Neumeier, **F. Stögbauer**, E. Lieberer, M. Bala, A. Kopp, A. Schäffler, C. Buechler, Adiponectin downregulates CD163 whose cellular and soluble forms are elevated in obesity, *Eur J Clin Invest* 39(8) (2009) 671-9

7 Literaturverzeichnis

- [1] J. A. Armitage, L. Poston, and P. D. Taylor, Developmental origins of obesity and the metabolic syndrome: the role of maternal obesity, *Front Horm Res* 36 (2008) 73-84.
- [2] N. M. Kaplan, The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension, *Arch Intern Med* 149 (1989) 1514-1520.
- [3] P. L. Huang, A comprehensive definition for metabolic syndrome, *Dis Model Mech* 2 (2009) 231-237.
- [4] R. N. Bergman, S. P. Kim, I. R. Hsu, K. J. Catalano, J. D. Chiu, M. Kabir, J. M. Richey, and M. Ader, Abdominal obesity: role in the pathophysiology of metabolic disease and cardiovascular risk, *Am J Med* 120 (2007) S3-8; discussion S29-32.
- [5] J. B. Meigs, Metabolic syndrome: in search of a clinical role, *Diabetes Care* 27 (2004) 2761-2763.
- [6] R. Bruffaerts, K. Demyttenaere, G. Vilagut, M. Martinez, A. Bonnewyn, R. De Graaf, J. M. Haro, S. Bernert, M. C. Angermeyer, T. Brugha, C. Roick, and J. Alonso, The relation between body mass index, mental health, and functional disability: a European population perspective, *Can J Psychiatry* 53 (2008) 679-688.
- [7] T. Gill, C. Chittleborough, A. Taylor, R. Ruffin, D. Wilson, and P. Phillips, Body mass index, waist hip ratio, and waist circumference: which measure to classify obesity?, *Soz Praventivmed* 48 (2003) 191-200.
- [8] D. P. Guh, W. Zhang, N. Bansback, Z. Amarsi, C. L. Birmingham, and A. H. Anis, The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis, *BMC Public Health* 9 (2009) 88.
- [9] V. Hainer, M. Kunesova, J. Parizkova, and A. Stunkard, [Health risks and economic costs associated with obesity requiring a comprehensive weight reduction program], *Cas Lek Cesk* 136 (1997) 367-372.
- [10] T. C. Otto, and M. D. Lane, Adipose development: from stem cell to adipocyte, *Crit Rev Biochem Mol Biol* 40 (2005) 229-242.
- [11] G. R. Hajer, T. W. van Haeften, and F. L. Visseren, Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases, *Eur Heart J* 29 (2008) 2959-2971.
- [12] B. G. Gabrielsson, J. M. Johansson, M. Lonn, M. Jernas, T. Olbers, M. Peltonen, I. Larsson, L. Lonn, L. Sjostrom, B. Carlsson, and L. M. Carlsson, High expression of

- complement components in omental adipose tissue in obese men, *Obes Res* 11 (2003) 699-708.
- [13] E. Dusserre, P. Moulin, and H. Vidal, Differences in mRNA expression of the proteins secreted by the adipocytes in human subcutaneous and visceral adipose tissues, *Biochim Biophys Acta* 1500 (2000) 88-96.
- [14] C. N. Lumeng, J. L. Bodzin, and A. R. Saltiel, Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization, *J Clin Invest* 117 (2007) 175-184.
- [15] M. Zeyda, D. Farmer, J. Todoric, O. Aszmann, M. Speiser, G. Gyori, G. J. Zlabinger, and T. M. Stulnig, Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production, *Int J Obes (Lond)* 31 (2007) 1420-1428.
- [16] T. Suganami, J. Nishida, and Y. Ogawa, A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25 (2005) 2062-2068.
- [17] T. Suganami, K. Tanimoto-Koyama, J. Nishida, M. Itoh, X. Yuan, S. Mizuarai, H. Kotani, S. Yamaoka, K. Miyake, S. Aoe, Y. Kamei, and Y. Ogawa, Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27 (2007) 84-91.
- [18] P. A. Permana, C. Menge, and P. D. Reaven, Macrophage-secreted factors induce adipocyte inflammation and insulin resistance, *Biochem Biophys Res Commun* 341 (2006) 507-514.
- [19] H. Ruan, N. Hacohen, T. R. Golub, L. Van Parijs, and H. F. Lodish, Tumor necrosis factor-alpha suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor-kappaB activation by TNF-alpha is obligatory, *Diabetes* 51 (2002) 1319-1336.
- [20] L. N. Bell, L. Cai, B. H. Johnstone, D. O. Traktuev, K. L. March, and R. V. Considine, A central role for hepatocyte growth factor in adipose tissue angiogenesis, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294 (2008) E336-344.
- [21] N. Hosogai, A. Fukuhara, K. Oshima, Y. Miyata, S. Tanaka, K. Segawa, S. Furukawa, Y. Tochino, R. Komuro, M. Matsuda, and I. Shimomura, Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation, *Diabetes* 56 (2007) 901-911.

- [22] P. Gual, Y. Le Marchand-Brustel, and J. F. Tanti, Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation, *Biochimie* 87 (2005) 99-109.
- [23] J. L. Leahy, Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus, *Arch Med Res* 36 (2005) 197-209.
- [24] Y. F. Zhao, D. D. Feng, and C. Chen, Contribution of adipocyte-derived factors to beta-cell dysfunction in diabetes, *Int J Biochem Cell Biol* 38 (2006) 804-819.
- [25] S. Li, H. J. Shin, E. L. Ding, and R. M. van Dam, Adiponectin levels and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis, *Jama* 302 (2009) 179-188.
- [26] J. Pietzsch, S. Subat, S. Nitzsche, W. Leonhardt, K. U. Schentke, and M. Hanefeld, Very fast ultracentrifugation of serum lipoproteins: influence on lipoprotein separation and composition, *Biochim Biophys Acta* 1254 (1995) 77-88.
- [27] G. Löffler, Petrides, P. E., Heinrich, P. C., *Biochemie und Pathobiochemie*, 8. ed., Springer 2006.
- [28] W. Siegenthaler, Blum, H. E., *Klinische Pathophysiologie*, 9 ed., Thieme 2006.
- [29] B. L. Knight, ATP-binding cassette transporter A1: regulation of cholesterol efflux, *Biochem Soc Trans* 32 (2004) 124-127.
- [30] A. D. Attie, J. P. Kastelein, and M. R. Hayden, Pivotal role of ABCA1 in reverse cholesterol transport influencing HDL levels and susceptibility to atherosclerosis, *J Lipid Res* 42 (2001) 1717-1726.
- [31] M. Bodzioch, E. Orso, J. Klucken, T. Langmann, A. Bottcher, W. Diederich, W. Drobnik, S. Barlage, C. Buchler, M. Porsch-Ozcurumez, W. E. Kaminski, H. W. Hahmann, K. Oette, G. Rothe, C. Aslanidis, K. J. Lackner, and G. Schmitz, The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease, *Nat Genet* 22 (1999) 347-351.
- [32] G. Assmann, and A. M. Gotto, Jr., HDL cholesterol and protective factors in atherosclerosis, *Circulation* 109 (2004) III8-14.
- [33] M. J. Chapman, G. Assmann, J. C. Fruchart, J. Shepherd, and C. Sirtori, Raising high-density lipoprotein cholesterol with reduction of cardiovascular risk: the role of nicotinic acid--a position paper developed by the European Consensus Panel on HDL-C, *Curr Med Res Opin* 20 (2004) 1253-1268.
- [34] L. Calabresi, M. Gomaraschi, and G. Franceschini, Endothelial protection by high-density lipoproteins: from bench to bedside, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23 (2003) 1724-1731.

- [35] H. E. Bays, "Sick fat," metabolic disease, and atherosclerosis, *Am J Med* 122 (2009) S26-37.
- [36] A. H. Klerkx, K. El Harchaoui, W. A. van der Steeg, S. M. Boekholdt, E. S. Stroes, J. J. Kastelein, and J. A. Kuivenhoven, Cholesteryl ester transfer protein (CETP) inhibition beyond raising high-density lipoprotein cholesterol levels: pathways by which modulation of CETP activity may alter atherogenesis, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26 (2006) 706-715.
- [37] R. B. Ruggeri, Cholesteryl ester transfer protein: pharmacological inhibition for the modulation of plasma cholesterol levels and promising target for the prevention of atherosclerosis, *Curr Top Med Chem* 5 (2005) 257-264.
- [38] P. J. Barter, and J. J. Kastelein, Targeting cholesteryl ester transfer protein for the prevention and management of cardiovascular disease, *J Am Coll Cardiol* 47 (2006) 492-499.
- [39] M. Cucuianu, M. Coca, and N. Hancu, Reverse cholesterol transport and atherosclerosis. A mini review, *Rom J Intern Med* 45 (2007) 17-27.
- [40] P. Saha, B. Modarai, J. Humphries, K. Mattock, M. Waltham, K. G. Burnand, and A. Smith, The monocyte/macrophage as a therapeutic target in atherosclerosis, *Curr Opin Pharmacol* 9 (2009) 109-118.
- [41] J. Boren, M. Gustafsson, K. Skalen, C. Flood, and T. L. Innerarity, Role of extracellular retention of low density lipoproteins in atherosclerosis, *Curr Opin Lipidol* 11 (2000) 451-456.
- [42] B. D. Lamon, and D. P. Hajjar, Inflammation at the molecular interface of atherogenesis: an anthropological journey, *Am J Pathol* 173 (2008) 1253-1264.
- [43] S. K. Clinton, R. Underwood, L. Hayes, M. L. Sherman, D. W. Kufe, and P. Libby, Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis, *Am J Pathol* 140 (1992) 301-316.
- [44] B. Fuhrman, A. Partoush, N. Volkova, and M. Aviram, Ox-LDL induces monocyte-to-macrophage differentiation in vivo: Possible role for the macrophage colony stimulating factor receptor (M-CSF-R), *Atherosclerosis* 196 (2008) 598-607.
- [45] R. L. Silverstein, Inflammation, atherosclerosis, and arterial thrombosis: role of the scavenger receptor CD36, *Cleve Clin J Med* 76 Suppl 2 (2009) S27-30.
- [46] M. Merkel, [Diabetic dyslipoproteinemia: beyond LDL], *Dtsch Med Wochenschr* 134 (2009) 1067-1073.

- [47] M. Pfreundschuh, Schölmerich, J., Pathophysiologie, Pathobiochemie, 2 ed. 2004.
- [48] P. J. Barter, S. Nicholls, K. A. Rye, G. M. Anantharamaiah, M. Navab, and A. M. Fogelman, Antiinflammatory properties of HDL, *Circ Res* 95 (2004) 764-772.
- [49] Y. Uehara, T. Engel, Z. Li, C. Goepfert, S. Rust, X. Zhou, C. Langer, C. Schachtrup, J. Wiekowski, S. Lorkowski, G. Assmann, and A. von Eckardstein, Polyunsaturated fatty acids and acetoacetate downregulate the expression of the ATP-binding cassette transporter A1, *Diabetes* 51 (2002) 2922-2928.
- [50] N. Shanmugam, M. A. Reddy, M. Guha, and R. Natarajan, High glucose-induced expression of proinflammatory cytokine and chemokine genes in monocytic cells, *Diabetes* 52 (2003) 1256-1264.
- [51] F. Maingrette, and G. Renier, Leptin increases lipoprotein lipase secretion by macrophages: involvement of oxidative stress and protein kinase C, *Diabetes* 52 (2003) 2121-2128.
- [52] J. P. Mauldin, M. H. Nagelin, A. J. Wojcik, S. Srinivasan, M. D. Skafien, C. R. Ayers, C. A. McNamara, and C. C. Hedrick, Reduced expression of ATP-binding cassette transporter G1 increases cholesterol accumulation in macrophages of patients with type 2 diabetes mellitus, *Circulation* 117 (2008) 2785-2792.
- [53] I. J. Kullo, D. D. Hensrud, and T. G. Allison, Comparison of numbers of circulating blood monocytes in men grouped by body mass index (<25, 25 to <30, > or =30), *Am J Cardiol* 89 (2002) 1441-1443.
- [54] M. Boschmann, S. Engeli, F. Adams, K. Gorzelniak, G. Franke, S. Klaua, U. Kreuzberg, S. Luedtke, R. Kettritz, A. M. Sharma, F. C. Luft, and J. Jordan, Adipose tissue metabolism and CD11b expression on monocytes in obese hypertensives, *Hypertension* 46 (2005) 130-136.
- [55] L. Duvillard, E. Florentin, G. Lizard, J. M. Petit, F. Galland, S. Monier, P. Gambert, and B. Verges, Cell surface expression of LDL receptor is decreased in type 2 diabetic patients and is normalized by insulin therapy, *Diabetes Care* 26 (2003) 1540-1544.
- [56] C. Cipolletta, K. E. Ryan, E. V. Hanna, and E. R. Trimble, Activation of peripheral blood CD14+ monocytes occurs in diabetes, *Diabetes* 54 (2005) 2779-2786.
- [57] G. Rothe, H. Gabriel, E. Kovacs, J. Klucken, J. Stohr, W. Kindermann, and G. Schmitz, Peripheral blood mononuclear phagocyte subpopulations as cellular

markers in hypercholesterolemia, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16 (1996) 1437-1447.

[58] K. H. Han, K. O. Han, S. R. Green, and O. Quehenberger, Expression of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor CCR2 is increased in hypercholesterolemia. Differential effects of plasma lipoproteins on monocyte function, *J Lipid Res* 40 (1999) 1053-1063.

[59] C. D. Garlachs, S. John, A. Schmeisser, S. Eskafi, C. Stumpf, M. Karl, M. Goppelt-Struebe, R. Schmieder, and W. G. Daniel, Upregulation of CD40 and CD40 ligand (CD154) in patients with moderate hypercholesterolemia, *Circulation* 104 (2001) 2395-2400.

[60] P. E. Scherer, Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ, *Diabetes* 55 (2006) 1537-1545.

[61] Y. Sun, K. Xun, C. Wang, H. Zhao, H. Bi, X. Chen, and Y. Wang, Adiponectin, an unlocking adipocytokine, *Cardiovasc Ther* 27 (2009) 59-75.

[62] F. Schober, M. Neumeier, J. Weigert, S. Wurm, J. Wanninger, A. Schaffler, A. Dada, G. Liebisch, G. Schmitz, C. Aslanidis, and C. Buechler, Low molecular weight adiponectin negatively correlates with the waist circumference and monocytic IL-6 release, *Biochem Biophys Res Commun* 361 (2007) 968-973.

[63] X. Mao, J. Y. Hong, and L. Q. Dong, The adiponectin signaling pathway as a novel pharmacological target, *Mini Rev Med Chem* 6 (2006) 1331-1340.

[64] P. E. Scherer, S. Williams, M. Fogliano, G. Baldini, and H. F. Lodish, A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes, *J Biol Chem* 270 (1995) 26746-26749.

[65] D. Giannessi, M. Maltinti, and S. Del Ry, Adiponectin circulating levels: a new emerging biomarker of cardiovascular risk, *Pharmacol Res* 56 (2007) 459-467.

[66] R. Wolk, P. Berger, R. J. Lennon, E. S. Brilakis, D. E. Davison, and V. K. Somers, Association between plasma adiponectin levels and unstable coronary syndromes, *Eur Heart J* 28 (2007) 292-298.

[67] J. P. Whitehead, A. A. Richards, I. J. Hickman, G. A. Macdonald, and J. B. Prins, Adiponectin--a key adipokine in the metabolic syndrome, *Diabetes Obes Metab* 8 (2006) 264-280.

[68] M. Guerre-Millo, Adiponectin: an update, *Diabetes Metab* 34 (2008) 12-18.

[69] T. Yamauchi, J. Kamon, H. Waki, Y. Terauchi, N. Kubota, K. Hara, Y. Mori, T. Ide, K. Murakami, N. Tsuboyama-Kasaoka, O. Ezaki, Y. Akanuma, O. Gavrilova, C.

Vinson, M. L. Reitman, H. Kagechika, K. Shudo, M. Yoda, Y. Nakano, K. Tobe, R. Nagai, S. Kimura, M. Tomita, P. Froguel, and T. Kadowaki, The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity, *Nat Med* 7 (2001) 941-946.

[70] T. P. Combs, A. H. Berg, S. Obici, P. E. Scherer, and L. Rossetti, Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30, *J Clin Invest* 108 (2001) 1875-1881.

[71] K. Hotta, T. Funahashi, N. L. Bodkin, H. K. Ortmeyer, Y. Arita, B. C. Hansen, and Y. Matsuzawa, Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys, *Diabetes* 50 (2001) 1126-1133.

[72] R. S. Lindsay, T. Funahashi, R. L. Hanson, Y. Matsuzawa, S. Tanaka, P. A. Tataranni, W. C. Knowler, and J. Krakoff, Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population, *Lancet* 360 (2002) 57-58.

[73] N. Ouchi, S. Kihara, Y. Arita, K. Maeda, H. Kuriyama, Y. Okamoto, K. Hotta, M. Nishida, M. Takahashi, T. Nakamura, S. Yamashita, T. Funahashi, and Y.

Matsuzawa, Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin, *Circulation* 100 (1999) 2473-2476.

[74] N. Ouchi, S. Kihara, Y. Arita, Y. Okamoto, K. Maeda, H. Kuriyama, K. Hotta, M. Nishida, M. Takahashi, M. Muraguchi, Y. Ohmoto, T. Nakamura, S. Yamashita, T. Funahashi, and Y. Matsuzawa, Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway, *Circulation* 102 (2000) 1296-1301.

[75] N. Ouchi, S. Kihara, Y. Arita, M. Nishida, A. Matsuyama, Y. Okamoto, M. Ishigami, H. Kuriyama, K. Kishida, H. Nishizawa, K. Hotta, M. Muraguchi, Y. Ohmoto, S. Yamashita, T. Funahashi, and Y. Matsuzawa, Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages, *Circulation* 103 (2001) 1057-1063.

[76] K. Tsubakio-Yamamoto, F. Matsuura, M. Koseki, H. Oku, J. C. Sandoval, M. Inagaki, K. Nakatani, H. Nakaoka, R. Kawase, M. Yuasa-Kawase, D. Masuda, T. Ohama, N. Maeda, Y. Nakagawa-Toyama, M. Ishigami, M. Nishida, S. Kihara, I. Shimomura, and S. Yamashita, Adiponectin prevents atherosclerosis by increasing

- cholesterol efflux from macrophages, *Biochem Biophys Res Commun* 375 (2008) 390-394.
- [77] L. Tian, N. Luo, R. L. Klein, B. H. Chung, W. T. Garvey, and Y. Fu, Adiponectin reduces lipid accumulation in macrophage foam cells, *Atherosclerosis* 202 (2009) 152-161.
- [78] M. Kumada, S. Kihara, S. Sumitsuji, T. Kawamoto, S. Matsumoto, N. Ouchi, Y. Arita, Y. Okamoto, I. Shimomura, H. Hiraoka, T. Nakamura, T. Funahashi, and Y. Matsuzawa, Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23 (2003) 85-89.
- [79] T. Grewal, and C. Enrich, Molecular mechanisms involved in Ras inactivation: the annexin A6-p120GAP complex, *Bioessays* 28 (2006) 1211-1220.
- [80] A. A. Davies, S. E. Moss, M. R. Crumpton, T. A. Jones, N. K. Spurr, D. Sheer, C. Kozak, and M. J. Crumpton, The gene coding for the p68 calcium-binding protein is localised to bands q32-q34 of human chromosome 5, and to mouse chromosome 11, *Hum Genet* 82 (1989) 234-238.
- [81] H. C. Edwards, and S. E. Moss, Functional and genetic analysis of annexin VI, *Mol Cell Biochem* 149-150 (1995) 293-299.
- [82] M. Pons, T. Grewal, E. Rius, T. Schnitgerhans, S. Jackle, and C. Enrich, Evidence for the Involvement of annexin 6 in the trafficking between the endocytic compartment and lysosomes, *Exp Cell Res* 269 (2001) 13-22.
- [83] I. de Diego, F. Schwartz, H. Siegfried, P. Dauterstedt, J. Heeren, U. Beisiegel, C. Enrich, and T. Grewal, Cholesterol modulates the membrane binding and intracellular distribution of annexin 6, *J Biol Chem* 277 (2002) 32187-32194.
- [84] D. M. Clark, S. E. Moss, N. A. Wright, and M. J. Crumpton, Expression of annexin VI (p68, 67 kDa-calelectrin) in normal human tissues: evidence for developmental regulation in B- and T-lymphocytes, *Histochemistry* 96 (1991) 405-412.
- [85] P. Podszywalow-Bartnicka, A. Strzelecka-Kiliszek, J. Bandorowicz-Pikula, and S. Pikula, Calcium- and proton-dependent relocation of annexin A6 in Jurkat T cells stimulated for interleukin-2 secretion, *Acta Biochim Pol* 54 (2007) 261-271.
- [86] H. C. Lin, T. C. Sudhof, and R. G. Anderson, Annexin VI is required for budding of clathrin-coated pits, *Cell* 70 (1992) 283-291.

- [87] C. Buechler, M. Ritter, E. Orso, T. Langmann, J. Klucken, and G. Schmitz, Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli, *J Leukoc Biol* 67 (2000) 97-103.
- [88] C. Buechler, M. Ritter, C. D. Quoc, A. Agildere, and G. Schmitz, Lipopolysaccharide inhibits the expression of the scavenger receptor Cla-1 in human monocytes and macrophages, *Biochem Biophys Res Commun* 262 (1999) 251-254.
- [89] J. Bernardo, A. M. Billingslea, M. F. Ortiz, K. F. Seetoo, J. Macauley, and E. R. Simons, Adherence-dependent calcium signaling in monocytes: induction of a CD14-high phenotype, stimulus-responsive subpopulation, *J Immunol Methods* 209 (1997) 165-175.
- [90] C. Buechler, H. Ullrich, M. Ritter, M. Porsch-Oezcueruemez, K. J. Lackner, S. Barlage, S. O. Friedrich, G. M. Kostner, and G. Schmitz, Lipoprotein (a) up-regulates the expression of the plasminogen activator inhibitor 2 in human blood monocytes, *Blood* 97 (2001) 981-986.
- [91] E. Camors, V. Monceau, and D. Charlemagne, Annexins and Ca²⁺ handling in the heart, *Cardiovasc Res* 65 (2005) 793-802.
- [92] P. Trouve, S. Legot, I. Belikova, F. Marotte, D. Benevolensky, F. Russo-Marie, J. L. Samuel, and D. Charlemagne, Localization and quantitation of cardiac annexins II, V, and VI in hypertensive guinea pigs, *Am J Physiol* 276 (1999) H1159-1166.
- [93] G. Song, B. Campos, L. E. Wagoner, J. R. Dedman, and R. A. Walsh, Altered cardiac annexin mRNA and protein levels in the left ventricle of patients with end-stage heart failure, *J Mol Cell Cardiol* 30 (1998) 443-451.
- [94] L. Cubells, S. Vila de Muga, F. Tebar, P. Wood, R. Evans, M. Ingelmo-Torres, M. Calvo, K. Gaus, A. Pol, T. Grewal, and C. Enrich, Annexin A6-induced alterations in cholesterol transport and caveolin export from the Golgi complex, *Traffic* 8 (2007) 1568-1589.
- [95] T. Grewal, J. Heeren, D. Mewawala, T. Schnitgerhans, D. Wendt, G. Salomon, C. Enrich, U. Beisiegel, and S. Jackle, Annexin VI stimulates endocytosis and is involved in the trafficking of low density lipoprotein to the prelysosomal compartment, *J Biol Chem* 275 (2000) 33806-33813.
- [96] C. S. Kim, H. S. Park, T. Kawada, J. H. Kim, D. Lim, N. E. Hubbard, B. S. Kwon, K. L. Erickson, and R. Yu, Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters, *Int J Obes (Lond)* 30 (2006) 1347-1355.

- [97] G. Boden, Obesity and free fatty acids, *Endocrinol Metab Clin North Am* 37 (2008) 635-646, viii-ix.
- [98] T. Lajunen, P. Vikatmaa, A. Bloigu, T. Ikonen, M. Lepantalo, P. J. Pussinen, P. Saikku, and M. Leinonen, Chlamydial LPS and high-sensitivity CRP levels in serum are associated with an elevated body mass index in patients with cardiovascular disease, *Innate Immun* 14 (2008) 375-382.
- [99] G. Schimmack, R. A. Defronzo, and N. Musi, AMP-activated protein kinase: Role in metabolism and therapeutic implications, *Diabetes Obes Metab* 8 (2006) 591-602.
- [100] T. Yamauchi, Y. Nio, T. Maki, M. Kobayashi, T. Takazawa, M. Iwabu, M. Okada-Iwabu, S. Kawamoto, N. Kubota, T. Kubota, Y. Ito, J. Kamon, A. Tsuchida, K. Kumagai, H. Kozono, Y. Hada, H. Ogata, K. Tokuyama, M. Tsunoda, T. Ide, K. Murakami, M. Awazawa, I. Takamoto, P. Froguel, K. Hara, K. Tobe, R. Nagai, K. Ueki, and T. Kadowaki, Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions, *Nat Med* 13 (2007) 332-339.
- [101] P. Misra, AMP activated protein kinase: a next generation target for total metabolic control, *Expert Opin Ther Targets* 12 (2008) 91-100.
- [102] K. Fujita, N. Maeda, M. Sonoda, K. Ohashi, T. Hibuse, H. Nishizawa, M. Nishida, A. Hiuge, A. Kurata, S. Kihara, I. Shimomura, and T. Funahashi, Adiponectin protects against angiotensin II-induced cardiac fibrosis through activation of PPAR-alpha, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28 (2008) 863-870.
- [103] M. Neumeier, J. Weigert, A. Schaffler, T. S. Weiss, C. Schmidl, R. Buttner, C. Bollheimer, C. Aslanidis, J. Scholmerich, and C. Buechler, Aldehyde oxidase 1 is highly abundant in hepatic steatosis and is downregulated by adiponectin and fenofibric acid in hepatocytes in vitro, *Biochem Biophys Res Commun* 350 (2006) 731-735.
- [104] J. Weigert, M. Neumeier, J. Wanninger, S. Wurm, A. Kopp, F. Schober, M. Filarsky, A. Schaffler, M. Zeitoun, C. Aslanidis, and C. Buechler, Reduced response to adiponectin and lower abundance of adiponectin receptor proteins in type 2 diabetic monocytes, *FEBS Lett* 582 (2008) 1777-1782.
- [105] T. Frey, and A. De Maio, Increased expression of CD14 in macrophages after inhibition of the cholesterol biosynthetic pathway by lovastatin, *Mol Med* 13 (2007) 592-604.

[106] A. E. Christian, M. P. Haynes, M. C. Phillips, and G. H. Rothblat, Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content, *J Lipid Res* 38 (1997) 2264-2272.

[107] G. Schmitz, and T. Langmann, Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression, *Biochim Biophys Acta* 1735 (2005) 1-19.

[108] C. Li, Xu, M., Gu, Q., ATP Binding Cassette Transporter G1 Gene Expression Is Reduced in Type 2 Diabetic Patients, *Endocr J* (2008).

Lebenslauf

Name: Fabian Sebastian Stögbauer

Geburtsdatum: 06.07.1983

Geburtsort: Pfarrkirchen

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung: 09/1990 – 07/1994 Grundschule Bad Griesbach

09/1994 – 06/2003 Maristengymnasium Fürstzell

Universitäre Bildung: 10/2003 – 03/2004 Technische Universität München
(Studiengang: Finanz- und
Wirtschaftsmathematik)

04/2004 – 09/2009 Universität Regensburg
(Studiengang: Zahnmedizin)

06/2009 Staatsexamen Zahnmedizin

06.07.2009 Approbation als Zahnarzt

Danksagung

Diese Arbeit entstand in der Zeit von April 2007 bis September 2009 in der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Regensburg. Bei Herrn Prof. Dr. Jürgen Schölmerich möchte ich mich an dieser Stelle für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Doktorarbeit recht herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. rer. nat. Christa Büchler, welche die Betreuung meiner Arbeit und die Erstellung des Erstgutachtens übernahm. Danken möchte ich ihr für alle Bemühungen, einem Zahnmediziner die naturwissenschaftliche Forschung näher zu bringen, für alle Anregungen, erklärenden Worte und insbesondere dafür, dass sie jederzeit ansprechbar war und mich stets mit Rat und Tat unterstützte.

Ebenso Dank sagen möchte ich den wissenschaftlichen Mitarbeitern Dr. rer. nat. Markus Neumeier, Johanna Weigert, Josef Wanninger und Sabrina Bauer, die mir alle Arbeitsabläufe erklärten, die mir bei allen kleineren und größeren Problemen im Labor helfen konnten, die auf alle meine Fragen eine Antwort hatten und mit denen ich stets eine angenehme Zeit innerhalb und außerhalb des Labors verbrachte.

Danken möchte ich auch meinen Laborkollegen Sylvia, Franziska, Markus, Daniela, Michael, Tanja, Kerstin Andrea, Iris und Christl, die stets hilfsbereit waren und welche mir mit viel Humor und unterhaltsamen Gesprächen die Zeit im Labor in sehr guter Erinnerung bleiben lassen.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, allen voran meinen Eltern und meiner Freundin Amelia, die mir, nicht nur in der Zeit dieser Doktorarbeit, stets mit viel Verständnis, einem offenen Ohr, immer aufmerksam und jederzeit aufmunternd zur Seite stehen.

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, 24.09.2009

Fabian Stögbauer