

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I der Julius-
Maximilians- Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. Georg Ertl

**TRB3- Knockdown in THP-1- Zellen und Makrophagen und dessen
Auswirkung auf die zelluläre Cholesterinaufnahme**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Christian, Paulus, Marcel Kafka

aus Landshut

Würzburg, Juni 2016

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. D. Weismann

Koreferent/Koreferentin: Univ.- Prof. Dr. med. Alma Zerneckemadsen

Dekan: Univ.- Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

25.01.2018

Der Promovend ist Arzt.

Für meine Eltern und meinen Bruder

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2 Begriffliche und theoretische Grundlagen	5
2.1 Cholesterin, seine physiologische und pathologische Bedeutung.	5
2.1.1 Chemischer Aufbau und Funktion von Cholesterin	5
2.1.2 Stoffwechsel von Cholesterin.....	8
2.1.2.1 Exogener Stoffwechsel: Intestinale Lipidresorption und Lipidtransport in die Leber	8
2.1.2.2 Endogener Cholesterin-Stoffwechsel: Synthese hepatischer Apolipoproteine und Transport von Lipiden zu extrahepatischen Zellen	11
2.1.2.3 Cholesterinbiosynthese	14
2.1.2.4 Reverser Cholesterintransport	16
2.2 Makrophagen.....	17
2.2.1	17
2.2.1 Entstehung und Entwicklung von Monozyten und Makrophagen	17
2.2.2 Funktion der Makrophagen.....	18
2.2.3 ER-Stress in Makrophagen	25
2.3 TRB3 (Tribbles homolog 3) (= SKIP3; NIPK3).....	29
2.3.1 Bedeutung und Aufbau	29
2.3.2 Funktion von TRB3/TRIB3	32
2.4 CHOP (C/EBP homologous protein)	35

2.5	BAX (Bcl-2- associated X protein).....	39
2.6	Fragestellung dieser Arbeit	45
3	Zellrekrutierung, Material und Methoden.....	47
3.1	Zellrekrutierung.....	47
3.1.1	Zelllinie THP-1	47
3.2	Material	48
3.2.1	Geräte.....	48
3.2.2	Chemikalien, Kits, Antikörper, Sonden und Verbrauchsmaterialien.....	52
3.2.3	Puffer Lösungen.....	57
3.3	Methoden.....	57
3.3.1	THP-1- Kultivierung.....	57
3.3.2	Differenzierung von THP-1- Zellen zu Makrophagen („macrophage- like- cells“).....	58
3.3.3	Zellzählung	61
3.3.4	Knockdown TRB3- mRNA in THP-1- Zellen und differenzierten Makrophagen (Abb. 14, 15)	62
3.3.5	Versuchsreihe PCR: unbehandelte und Thapsigargin stimulierte Zellen ± siRNA (Abb. 16, 17)	66
3.3.6	Ernten der THP-1- Zellen bzw. differenzierten Makrophagen und Vorbereitung für die rt- PCR	72
3.3.7	Ernten der THP-1- Zellen bzw. differenzierten Makrophagen und Vorbereitung für den Western Blot (Proteinisolation)	73
3.3.8	Molekularbiologische Methoden	75

3.3.8.1	RNA- Isolierung.....	75
3.3.8.2	Messung der RNA- Konzentrationen.....	76
3.3.8.3	Umschreibug von RNA in cDNA (reverse Transkriptase).....	77
3.3.8.4	rt-PCR (real time Polymerase chain reaction).....	78
3.3.9	Proteinchemische Methoden.....	85
3.3.9.1	Proteinbestimmung mittels BCA- Assay	85
3.3.10	Western Blot.....	87
3.3.10.1	SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese	87
3.3.10.2	Proteinübertragung (Semi- Dry Blot).....	92
3.3.10.3	Membranblockade und Beladung mit Antikörpern.....	94
3.3.11	Versuchsreihe Cholesterin- Uptake	96
3.3.12	Fluoreszenzspektrometrie: BODIPY® Cholesterin.....	98
3.3.13	Statistische Analysen.....	99
4.	Ergebnisse	101
4.1	Differenzierung von THP-1- Zellen zu differenzierten Makrophagen mittels 12- phorbol- myristate- acetate (PMA).....	101
4.2	TRB3- mRNA- Expression in humanen THP-1- Zellen und in differenzierten Makrophagen	101
4.3	TRB3- mRNA Knockdown in THP-1- Zellen und differenzierten Makrophagen	104
4.4	Effekte von Thapsigargin auf TRB3- mRNA- Expression in THP-1- Zellen und differenzierten Makrophagen	107

4.5	Effekte von Thapsigargin auf TRB3- mRNA- Expression in THP-1- Zellen (siRNA -/-) und differenzierten Makrophagen (siRNA -/-)“	111
4.6	Einfluss unterschiedlicher TG- Dosierungen auf CHOP- mRNA (ER-Stress- Marker) in THP- 1- Zellen und differenzierten Makrophagen	115
4.7	Einfluss von TRB3- Knockdown auf CHOP- mRNA- Expression in THP-1- Zellen und differenzierten Makrophagen	118
4.8	Einfluss von Thapsigargin auf CHOP- mRNA- Expression in THP-1- Zellen (siRNA -/-) und differenzierten Makrophagen (siRNA -/-)	120
4.9	BAX- mRNA in THP-1- Zellen und differenzierten Makrophagen	125
4.10	Einfluss von TRB3- Knockdown auf BAX- mRNA- Expression in THP-1- Zellen und differenzierten Makrophagen	128
4.11	Einfluss von Thapsigargin auf BAX- mRNA- Expression in THP- 1- Zellen (siRNA -/-) und differenzierten Makrophagen (siRNA -/-)	130
4.12	Einfluss der TRB3- Überexpression auf die Cholesterinaufnahme in THP- 1- Zellen und differenzierten Makrophagen	134
4.13	Einfluss von TRB3- Knockdown (+/- TG- Stimulation) auf den Cholesterin- Uptake in THP-1- Zellen und differenzierten Makrophagen.	136
5	Diskussion	140
6	Zusammenfassung	158
7	Literaturverzeichnis	

Abkürzungsverzeichnis

(-/-)	Knockdown
(+/+)	kein Knockdown
ACAT	Acyl- CoA- Cholesterin Acyltransferase/ Sterol- O- Acyltransferase
Abb.	Abbildung
ABCA- 1	ATB- binding cassette transporter
ABCG1	ATP- binding cassette sub- family G member 1
Acyl- CoA	Acyl- Coenzym A
ac LDL	acetyliertes LDL
Akt	Protein kinase B
Apo	Apolipoprotein
APS	Ammoniumpersulfat
ATF4	Activating transcription factor 4
ATP	Adenosintriphosphat
ASK 1	Apoptosis signal- regulating kinase
BAD	Bcl-2 associated death promoter
BAK	Bcl- 2 homologous antagonist killer

BAX	Bcl-2 associated X protein
BCA	Bicinchoninic acid assay
Bcl- 2	B- cell lymphoma 2
Bcl- xL	B- cell lymphoma- extra large
BH	Bcl 2 homology domain
BID	BH3 interacting- domain
BIK	Bcl- 2 interacting killer
BIM	proapoptotic member of Bcl- 2 family
BODIPY	boron- dipyrromethene
BOK	Bcl- 2 related ovarian killer
BSA	Bovine serum albumin
bZIP	c- terminal basic- leucine zipper domain
c	Nukleinsäurekonzentration
CD	cluster of differentiation
Cdc25	cell division cycle 25
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CE	Cholesterinester
C/EBP	CCAAT- enhancer- binding- proteins

CHOP	C/EBP homologous protein oder DNA damage-inducible transcript 3
d	Schichtdicke
Dest. H2O	destilliertes Wasser
E	Extinktion
ϵ	wellenabhängiger E- Koeffizient
ECL	Elektrochemilumineszenz
ECM	Extrazellulärmatrix
eE	early Endosomes
eIF2a	Eukaryotic initiation factor 2a
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular signal- regulated- kinase
FAM	Carboxyfluorescein
FFA	freie Fettsäuren
FC	freies Cholesterin
FCS	Fetales Kälber Serum
FLD	fatty liver dystrophy
FOXO	Forkhead box protein O

GA	Golgi- Apparat
GADD 153 153	Growth arrest and DNA damage inducible gene
GEMM- CFU	Granulocyte, erythrocyte, monocy, megakaryocyte colony forming unit
GM- CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor
GM- CFU	Granulocyte macrophage colony forming unit
GRP 78	78 kDa glucose- regulated protein
h	Stunden
H2O	Wasser
H2O2	Wasserstoffperoxid
HCL	Salzsäure
HeLa	Henrietta Lacks cervical cancer cells
HepG2	Human liver hepatocellular carcinoma cell line
HDL	High density lipoprotein
HL	Hepatische Lipase
HMG	Hydromethylglutaryl

HRK	Activator of apoptosis hara-kiri
IDL	Intermediate density lipoprotein
IL	Interleukin
IRE- 1	Inositol requiring enzyme 1
JNK2	c- Jun- N- terminal kinase 2
kDa	Kilodalton
LDL	Low density lipoprotein
LPL	Lipoproteinlipase
LXR	Liver X- Rezeptor
mA	Miliampere
MAC	mitochondrial apoptosis-induced channels
Makro	Makrophagen
MAPK	Mitogen- activated protein kinase
M- CFU	Macrophage colony forming unit
MCL 1	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein
M- CSF	Macrophage colony stimulating factor
min	Minuten

MLK 3	mixed lineage kinase 3
MMP	Metalloproteinase
MMS	Methylmethansulfonat
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NCEH	neutral Cholesterinester- Hydrolase
NIPK	neuronal cell death inducible putative kinase
NO	Stickstoffmonoxid
O2	Sauerstoff
Opti- MEM	modification of Eagle's Minimum Essential Media
oxLDL	oxidiertes LDL
p53	tumor protein 53
p.a.	pro analysi (Reinheit entsprechend der Anforderung "zur Analyse")
PBS	Phosphate buffered saline
PERK	Pancreatic ER- kinase
PGE2	Prostaglandin- E2
pH	Pondus hydrogenii: Maß für die saure oder

alkalische Reaktion einer wässrigen Lösung

PL	Phospholipase
PM	Plasmamembran
PMA	12- phorbol- myristate- acetate
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
PPARγ	Peroxisom proliferator- activated receptor
RIPA	Radio- Immunoprecipitation Assay
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
rt- PCR	real- time- Polymerase- chain- reaction Lösung
RXR	Retinoid X- Rezeptor
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide
Sek	Sekunden
SEM	Standardfehler
SERCA	Sarco/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ - ATPase
slbo	slow border cells

SR	Scavenger- Rezeptor
SXBP1	Spliced X- box binding protein 1
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylenediamin
TGF- β	Transforming growth factor β
TG/Thap	Thapsigargin
TH1	T- Helfer Zelle 1
THP-1	Monozytäre Zellen gewonnen von einem 1- Jährigen männlichen Patienten mit akuter monozytärer Leukämie
TM	transmembrane region
TRAF2	TNF- receptor- associated factor 2
TRB3	Tribbles homolog 3 Gen (Drosophila)
TRIB3	Tribbles homolog 3 protein
TRIS	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan
ul	Mikroliter
UPR	unfolded protein response
V	Volt

VADC	Mitochondrial voltage- dependent anion channel
VLDL	Very low density lipoprotein
vs	versus
XBP1	X- box binding protein 1

Abbildungsverzeichnis

Nummerierung

<u>Bezeichnung</u>	<u>Seite</u>	
Abbildung 1:	Chemische Struktur von Cholesterin	5
Abbildung 2:	Endo- und exogener Lipidstoffwechsel	10
Abbildung 3:	Endozytische Aufnahme von Cholesterin	13
Abbildung 4:	Cholesterinbiosynthese	15
Abbildung 5:	Makrophagen Scavenger- Rezeptoren	22
Abbildung 6:	Regulation der ABCA 1- Expression und des zellulären Cholesterineffluxes	24
Abbildung 7:	ER-Stress und „unfolded protein response“	26
Abbildung 8:	Apoptose durch ER- Stress, MAPK und SRA- Beteiligung bei mit freiem Cholesterin- beladenen Makrophagen	28
Abbildung 9:	Domänenstruktur von CHOP	36
Abbildung 10:	Stuktur von Bcl2- assoziierten apoptotischen Regulatoren	40

Abbildung 11:	Proteine der Bcl2 Familie in ruhenden Zellen und unter ER- Stress- Bedingungen	42
Abbildung 12:	THP-1 Zellen im Phasenkontrastmikroskop	60
Abbildung 13:	Makrophagen im Phasenkontrastmikroskop	60
Abbildung 14:	Knockdown TRB-3 in THP-1 Zellen: Schematische Darstellung	65
Abbildung 15:	Knockdown TRB3 in Makrophagen: Schematische Darstellung	65
Abbildung 16:	THP-1 Versuchsreihe PCR: unbehandelte und Thapsigargin stimulierte Zellen \pm siRNA (Schematische Darstellung THP-1- Zellen)	68
Abbildung 17:	Makrophagen Versuchsreihe PCR: unbehandelte und Thapsigargin stimulierte Zellen \pm siRNA (Schematische Darstellung Makrophagen)	70
Abbildung 18:	TRB3 mRNA Expression in THP-1- Zellen und Makrophagen	103
Abbildung 19:	Western Blot: TRIB3- Protein in THP-1-Zellen und Makrophagen \pm TRB3 Knockdown	103

Abbildung 20:	TRB3- mRNA Expression und Knockdown in THP-1- Zellen	106
Abbildung 21:	TRB3 mRNA- Expression und Knockdown in Makrophagen	106
Abbildung 22:	TRB3- mRNA- Expression in THP-1 Zellen unter Thapsigargin	109
Abbildung 23:	TRB3- mRNA- Expression in Makrophagen unter Thapsigargin	110
Abbildung 24:	TRB3- mRNA- Expression in THP-1-Zellen unter Thapsigargin mit TRB3 Knockdown	112
Abbildung 25:	TRB3- mRNA- Expression in Makrophagen unter Thapsigargin mit TRB3 Knockdown	114
Abbildung 26:	CHOP- mRNA- Expression in THP-1- Zellen unter Thapsigargin	116
Abbildung 27:	CHOP- mRNA- Expression in Makrophagen unter Thapsigargin	118

Abbildung 28:	CHOP- mRNA- Expression in THP-1- Zellen unter TRB3 Knockdown	119
Abbildung 29:	CHOP- mRNA- Expression in Makrophagen unter TRB3- Knockdown	120
Abbildung 30:	CHOP- mRNA- Expression in THP-1- Zellen unter Thapsigargin mit TRB3 Knockdown	122
Abbildung 31:	CHOP- mRNA- Expression in Makrophagen unter Thapsigargin mit TRB3 Knockdown	124
Abbildung 32:	BAX- mRNA- Expression in THP-1-Zellen unter Thapsigargin	126
Abbildung 33:	BAX- mRNA- Expression in Makrophagen unter Thapsigargin	128
Abbildung 34:	BAX- mRNA- Expression in THP-1-Zellen unter TRB3 Knockdown	129
Abbildung 35:	BAX- mRNA- Expression in Makrophagen unter TRB3- Knockdown	130
Abbildung 36:	BAX- mRNA- Expression in THP-1- Zellen unter Thapsigargin mit TRB3 Knockdown	132

Abbildung 37:	BAX- mRNA- Expression in Makrophagen unter Thapsigargin mit TRB3 Knockdown	133
Abbildung 38:	Cholesterinaufnahme in THP-1- Zellen unter Thapsigargin	135
Abbildung 39:	Cholesterinaufnahme in Makrophagen unter Thapsigargin	136
Abbildung 40:	Cholesterinaufnahme in THP-1- Zellen unter Thapsigargin mit TRB3- Knockdown	137
Abbildung 41:	Cholesterinaufnahme in Makrophagen unter Thapsigargin mit TRB3- Knockdown	139

Tabellenverzeichnis

Nummerierung

<u>Bezeichnung</u>	<u>Seite</u>
Tabelle 1: Transport- und bindungsformen der Lipoproteine	6
Tabelle 2: Scavenger- Rezeptor- Arten	22
Tabelle 3: Geräte	48
Tabelle 4: Chemikalien, Kits, Antikörper, Sonden, Verbrauchsmaterialien	52

1. Einleitung

Die Atherosklerose ist eine der Haupterkrankungen der westlichen Welt und trägt mit annähernd 50% zur Mortalität in der Bevölkerung bei. Makrophagen sind auf Phagozytose spezialisierte Zellen und spielen eine wesentliche Rolle bei der Bildung atherosklerotischer Plaques. Makrophagen nehmen mehr Cholesterin pro Zelle auf als andere Zellen, ausgenommen Leberzellen und Enterozyten (Bukrinsky and Sviridov, 2006). Der größte Teil an Cholesterin in Zellen befindet sich in der Plasmamembran und wird für die Zellviabilität und die Zellproliferation benötigt (Goluszko and Nowicki, 2005; Shang et al., 2009). Die Akkumulation von Cholesterin und Cholesterinestern in Makrophagen und deren Transformation zu sogenannten Schaumzellen stellen einen wichtigen, initialen Schritt in der Atherom-Bildung dar (Liang et al., 2007; Lim et al., 2008; Tabas, 2005).

Die übermäßige Aufnahme von freiem Cholesterin in die Zelle beeinträchtigt die Funktion der Mitochondrien und des Endoplasmatischen Retikulums. Diese führt zur Synthese und Ansammlung von Proteinen mit fehlerhaften Faltungen, den sogenannten „unfolded Proteinen“ im Endoplasmatischen Retikulum, welche zu einer Belastung der Zelle (ER- Stress) führt (Liang et al., 2007). ER- Stress induziert eine erhöhte TRIB3- Expression und TRIB3- Proteinbildung (Liew et al., 2010; Ohoka et al., 2005). TRIB3 gehört zur Gruppe der Signalkaskadenregulierenden Proteine und kann Apoptose induzieren (Szegezdi et al., 2006). Bei anhaltendem und zunehmendem ER- Stress hemmt TRIB3 zellschützende Mechanismen und fördert proapoptotische Einflüsse. ER- Stress ist nicht nur bei kardiovaskulären Erkrankungen, sondern auch bei anderen Krankheiten wie Tumoren, neurodegenerativen Erkrankungen wie M.

Alzheimer, M. Kreutzfeld-Jakob und M. Huntington gesteigert (Szegezdi et al., 2006).

Die Korrelation zwischen Cholesterinanhäufung in Makrophagen und der Entstehung von Atherosklerose ist bekannt (Liang et al., 2007; Lim et al., 2008; Tabas, 2005), wobei eine übermäßige Aufnahme von Cholesterin zu ER- Stress und erhöhter TRB3- Expression beiträgt (Liew et al., 2010; Ohoka et al., 2005). Da auch ein TRB3- Knockdown zu einer Verbesserung des Cholesterin- Profils in insulinresistenten Nagern sowie ein systemischer TRB3- Knockdown zu einer Reduktion von Atherosklerose in ApoE-/-/ LDL-Rezeptor-/- Doppelknockout- Mäusen (Wang et al., 2012) führt, sollte nun der Effekt von TRB3 auf die Cholesterinaufnahme in THP-1- Zellen und differenzierten Makrophagen weiter untersucht werden.

Dies könnte für die Entwicklung von Medikamenten, mit dem Ziel die

Cholesterinaufnahme in die Zelle zu hemmen und die Atherosklerose günstig zu beeinflussen, von Bedeutung sein.

2 Begriffliche und theoretische Grundlagen

2.1 Cholesterin, seine physiologische und pathologische Bedeutung

2.1.1 Chemischer Aufbau und Funktion von Cholesterin

Cholesterin ($C_{27}H_{45}OH$) ist ein polyzyklischer Alkohol und wird wegen seines Sterangerüsts zu den Lipiden gezählt (Liscum, 2008).

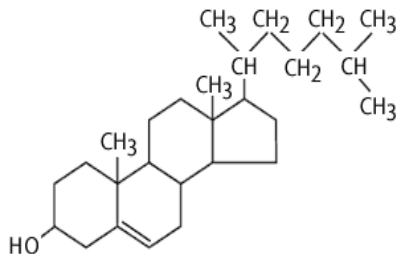



Abb. 1: Chemische Struktur von Cholesterin (Liscum, 2008).

Cholesterin ist nicht in Wasser löslich und wird daher durch Lipoproteine (VLDL, IDL, LDL und HDL) sowie Chylomikronen transportiert (Tab. 1).

	Kernlipid	Spez. Dichte	Apolipoprotein	Stoffwechsel
HDL	Phospholipid, Cholesterinester		A, E, C	> Aufnahme in die Leber oder > Cholesterinabgabe an LDL/VLDL
LDL	Cholesterinester		B-100	LDL – Rezeptor → Aufnahme (75% in die Leber)
IDL (VLDL-Remnants)	Cholesterinester, Triglyzerid		B-100, E, C	50% umgewandelt in LDL 50% Aufnahme in Leber
VLDL	Triglyzerid aus der Leber		C, B-100, E	Triglyzerid – Hydrolyse
Chylomikrone	Aus der Nahrung: Triglyzerid, Cholesterinester		B-48, C, E, A	Triglyzerid – Hydrolyse (Lipoproteinlipase) → FFA + Chylomikronenremnant
Chylomikrone n-Remnants	Cholesterinester, wenig Triglyzerid		B-48, C, E, A	Aufnahme in Leber

Tab. 1: Transport- und Bindungsformen der Lipoproteine in Anlehnung an (Freissmuth M, 2012)

85% des intrazellulären Cholesterins (bis zu 50 mol%) befindet sich in der Plasmamembran (PM). Organellen, die funktionell mit der PM in Verbindung stehen, wie Endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat, Mitochondrien und andere, weisen eine relativ niedrige Konzentration

(5 mol%) auf. Cholesterin dient der Aufrechterhaltung der Membranstabilität und reguliert die Funktionen der dort vorhandenen Rezeptoren, Enzyme und Ionenkanäle (Gimpl et al., 1997; Goluszko and Nowicki, 2005; Orci et al., 1981). Ferner dient es als Vorstufe bei der Synthese von Steroidhormonen (Testosteron, Östradiol, Progesteron, Kortikoiden) und Gallensäuren (Cholsäure und Glykocholsäure) (Voet D, 1995). Auch die Vitamin D- Synthese beruht auf einer Vorstufe von Cholesterin, nämlich des 7-Dehydrocholesterins (Gupta et al., 1989).

2.1.2 Stoffwechsel von Cholesterin

2.1.2.1 Exogener Stoffwechsel:

Intestinale Lipidresorption und Lipidtransport in die Leber

Größtenteils (ca. 70% bzw. 0,5- 1 g/d bei Erwachsenen) wird Cholesterin im Körper synthetisiert. Der verbleibende Anteil wird durch die Nahrung aufgenommen. In den Enterozyten des Dünndarms wird das freie Cholesterin mittels des Enzyms Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase (ACAT) in Cholesterinester umgewandelt. In der Mukosa vom Dünndarm bilden Apoproteine zusammen mit Triglyceriden und anderen Lipiden wie Cholesterinestern und Phospholipiden die Chylomikronen. Diese gelangen in die Lymphe und über den Ductus thoracicus in das Blutkreislaufsystem. Die Chylomikronen nehmen dort aus HDL Apolipoproteine (v.a. Apo C-2) auf,

was das Enzym Lipoproteinlipase (LPL) aktiviert. Durch LPL werden aus Chylomikronen Fettsäuren freigesetzt, welche ins Fettgewebe und in die Muskulatur aufgenommen werden. Die Chylomikronen-Remnants (reich an Cholesterinestern) werden durch die Aufnahme von Apo E aus HDL an Leberzellen gebunden und von diesen aufgenommen (Renz H, 2003; Siegenthaler W, 2006), (Abb. 2).

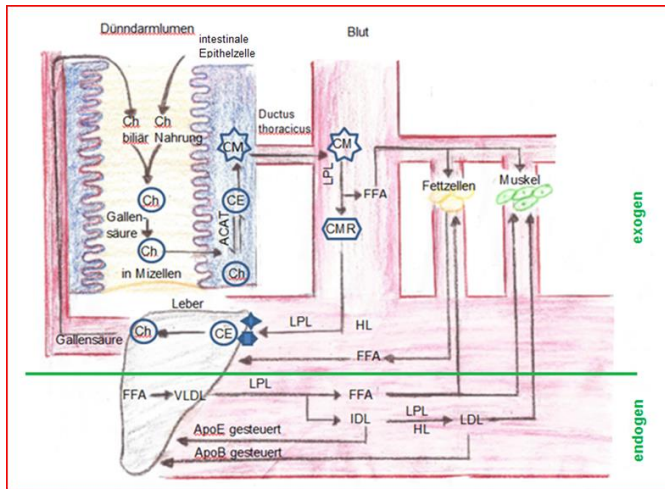


Abb. 2: Endo- und exogener Lipidstoffwechsel in Anlehnung an (Freissmuth M, 2012; Nanoff C).

Schematische Darstellung der Resorption von Lipiden im Intestinum und deren Transport zur Leber (exogener Stoffwechsel) und des Transports von VLDL- gebundenem Cholesterin ins periphere Gewebe (endogener Stoffwechsel) nach (Freissmuth M, 2012; Nanoff C). Ch = Cholesterin, CE = Cholesterinester, CM = Chylomikronen, CMR = Chylomikronen- Remnants, HL = hepatische Lipase, FFA = freie Fettsäuren, IDL = Intermediate density lipoprotein, LPL = Lipoproteinlipase, VLDL = Very low density lipoprotein,

◈ ◈ = LDL- und Chylomikronen- Remnant- Rezeptoren.

2.1.2.2 Endogener Cholesterin- Stoffwechsel: Synthese hepatischer Apolipoproteine und Transport von Lipiden zu extrahepatischen Zellen

Der Bedarf der extrahepatischen Zellen an Cholesterin wird durch die zelluläre Biosynthese, dabei vorrangig durch die Leber, gedeckt. Der endogene Lipoproteinstoffwechsel beginnt mit der Synthese von VLDL aus Triglyceriden, Cholesterinestern und Apo B-100 (Gibbons, 1990; Gordon and Jamil, 2000). Im Golgi-Apparat werden sekretorische Vesikel gebildet in denen VLDL zur Plasmamembran transportiert und später ins Blut freigesetzt werden. Reife VLDL beinhalten zu 60% Triglyceride, 20% Cholesterinester, Apo B-100, Apo C-2 und Apo E (Renz H, 2003). Über die LPL werden Triglyceride der VLDL in β -Monoglycerin und freie Fettsäuren gespalten und

danach von Fettzellen und Muskelgewebe aufgenommen (Abb. 2). Die im Blut verbliebenen VLDL- Remnants werden durch die LPL in IDL und später mit Hilfe der hepatischen Lipase (HL) zu LDL umgewandelt (Siegenthaler W, 2006). LDL- Partikel bestehen aus Apo B-100, Triglyceriden (5%), Cholesterinestern (45%) und Phospholipiden (25%). Unter der Vermittlung von Apo B-100 und Apo E binden sich LDL- Partikel an LDL- Rezeptoren der Zellen. Diese Rezeptoren befinden sich in Einstülpungen der Plasmamembran, den sogenannten „Clathrin-coated- pits“. Die an LDL- Rezeptoren gebundenen LDL- Partikel werden mittels Endozytose in „coated vesicles“ aufgenommen. Mehrere dieser „coated vesicles“ fusionieren zu Endosomen. Innerhalb der Endosomen führt ein niedriger pH-Wert von 5- 6 zur Dissoziation von LDL von den LDL- Rezeptoren. Die LDL- Rezeptoren werden durch verschiedene Prozesse wieder an die

Oberfläche der Plasmamembran zurückgeführt. Die LDL- beinhaltenden Endosomen binden sich an Lysosomen und werden dort zu Cholesterin und Aminosäuren abgebaut (Brown and Goldstein, 1979), (Abb. 3).

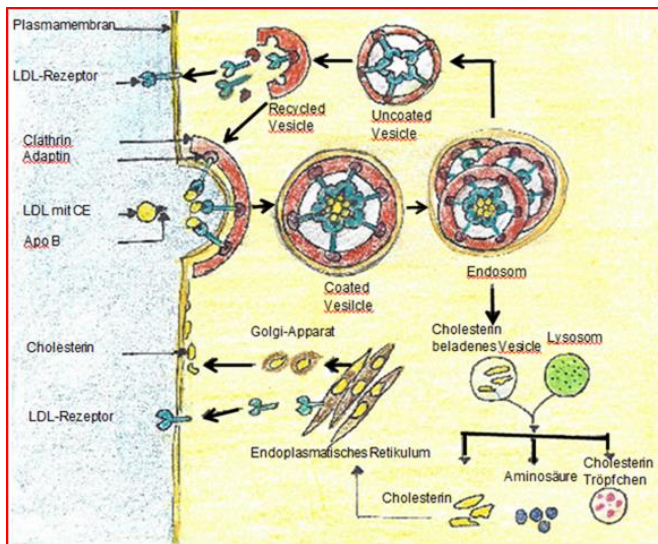


Abb. 3: Endozytotische Aufnahme von Cholesterin in Anlehnung an (Gaw A, 2004; Nemezc G).

Lipoproteine (LDL) werden von Lipoproteinrezeptoren (LDL- Rezeptor) nach ihrer Bindung an Apolipoproteine in Form einer „coated-pit“- Endozytose aufgenommen. In

Endosomen werden die Rezeptoren von ihren Liganden getrennt und wandern dann zurück an die Zelloberfläche. Die aufgenommenen Lipoproteine werden in Lysosomen katabolisiert. Dabei werden die Apolipoproteine abgebaut während Cholesterin zum Endoplasmatischen Retikulum transportiert wird, um dann entweder in Mitochondrien zu Steroidhormonen umgewandelt oder als Cholesterinester in zytoplasmatischen Lipidvesikeln gespeichert zu werden.

2.1.2.3 Cholesterinbiosynthese

Die Cholesterinbiosynthese findet mitochondrial vor allem in Leberzellen statt und wurde hauptsächlich von Goldstein analysiert und dargestellt (Goldstein and Brown, 1990; Goldstein et al., 2006; Waterham, 2002), (Abb. 4).

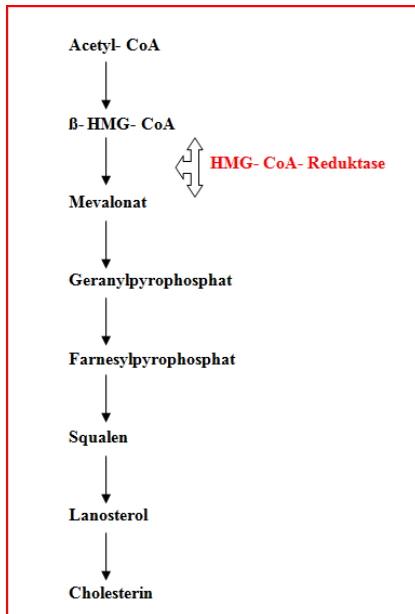


Abb. 4: Cholesterinbiosynthese in Anlehnung an (Goldstein et al., 2006).

Für die Cholesterinsynthese dient als Ausgangssubstanz Acetyl- CoA, die zu Acetoacetyl- CoA und später zu β - 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl- CoA (β - HMG- CoA) metabolisiert wird. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt besteht in der weiteren Umwandlung zu Mevalonat. Weitere Zwischenprodukte der Cholesterinbiosynthese sind Farnesyl- und Geranyl- Pyrophosphat, die für die zyklische Struktur des Squalens verantwortlich sind. Es folgt die Bildung von Lanosterol, woraus schließlich Cholesterin entsteht

2.1.2.4 Reverser Cholesterintransport

Während prinzipiell alle Körperzellen Cholesterin synthetisieren können, ist der Abbau von Cholesterin nur in der Leber möglich. Für diesen Rücktransport von Cholesterin von den peripheren Zellen in die Leber („reverser Cholesterintransport“) ist HDL verantwortlich. HDL entsteht aus Apo A-1, nicht- verestertem Cholesterin und Phospholipiden in Leber, Darm und auch im Blut (Cohen et al., 1999; Curtiss and Boisvert, 2000; Krieger, 1999). Zum einen können HDL- Partikel über Apo E- und Apo A-1 (ATP- Synthase β - chain)- Rezeptoren in die Leberzelle aufgenommen werden, zum anderen besteht ein Scavenger- Rezeptor B1 (SR B1) vermittelter Aufnahmeweg. In der Leber kommt es zur weiteren Verstoffwechslung des aufgenommenen

Cholesterins, wobei letzteres mit der Galle ausgeschieden wird (Curtiss and Boisvert, 2000).

2.2 Makrophagen

2.2.1 Entstehung und Entwicklung von Monozyten und Makrophagen

Monozyten entstammen CD 34 positiven Progenitorstammzellen im Knochenmark. Diese Zellen proliferieren und setzen Promonozyten in das Blut frei. Die daraus entstehenden Monozyten migrieren ins Gewebe, wo sie sich zu ortsständigen Makrophagen („resident tissue Makrophagen“) entwickeln (Ross JA, 2002). THP-1- Zellen sind monozytäre Zellen, die bei Leukämiepatienten isoliert wurden und zu Makrophagen differenziert werden können. Sie werden in Studien häufig eingesetzt um als Modell für das Verhalten und die Funktion von Monozyten und Makrophagen

herangezogen zu werden. Die Hämatopoese wird durch Transkriptionsfaktoren wie Wachstumsfaktoren, Interleukine und Hormone usw. reguliert.

2.2.2 Funktion der Makrophagen

Die gewebständigen („residential“) Makrophagen dienen der Abwehr von Mikroorganismen, der Reparatur von verletztem Gewebe und der Regulierung der Zellfunktion beschädigter Gewebszellen. Zudem besitzen sie noch andere Fähigkeiten: z. B. Phagozytose von alternden Erythrozyten in der Milz, Eisentransport zu den Erythroblasten im Knochenmark, Unterstützung der gewebständigen Immunabwehr in dendritischen Zellen und Mikroglia in Gehirn und Rückenmark (Ross JA, 2002; Takahashi K, 2001). Darüber hinaus tragen die Makrophagen durch die

Absonderung von Matrix- Metalloproteinase 2 (MMP-2), MMP-7, MMP-9 und MMP-12 zur Inflammation und zur Aufweichung im entzündeten Gewebe bei (Gibbs et al., 1999). Sie sind auch durch Produktion von Radikalen (NO, H₂O₂) für die Apoptose in Parenchym- und Stromazellen mitverantwortlich (Desmouliere et al., 1995; Kipari and Hughes, 2002). Durch die Phagozytose der apoptotischen Zellen wird die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine in den Makrophagen unterbunden. Im Gegensatz dazu triggern sie antiinflammatorische Prozesse durch die Produktion von IL-4, IL-10, PGE₂ und TGF- β (Duffield et al., 2001; Voll et al., 1997).

Jede Art von Stimuli, die auf lokalen Gewebestörungen/-änderungen beruhen, führen zu einer raschen Rekrutierung von Makrophagen. Die neu rekrutierten Makrophagen weisen viele phänotypische Unterschiede zu den „residential“ (= gewebständigen) Makrophagen auf. Dieser

Prozess wird als „Makrophagen- Aktivierung“ bezeichnet (Classen et al., 2009; Stein et al., 1992).

Zum einen werden pathogene Noxen durch Opsonisierung erkannt, zum anderen weil sie direkt an die Rezeptoren der Makrophagen gebunden und sofort als „Fremdsubstanzen“ erkannt werden (Janeway, 1992). Bei diesen Rezeptoren handelt es sich um Scavenger-Rezeptoren (Brown and Goldstein, 1979; Krieger, 1992).

Scavenger- Rezeptoren sind eine große Familie von Oberflächenrezeptoren mit einem breiten Spektrum an endo- und exogenen Liganden. Neben ihrer endozytotischen Eigenschaft kooperieren die Scavenger- Rezeptoren mit anderen Rezeptortypen und verstärken deren Abwehrpotenzial (Kzhyshkowska et al., 2012). Darüber hinaus sind die Scavenger- Rezeptoren bei der Entstehung der Atherosklerose involviert. Erhöhter oxidativer

Stress in der Gefäßwand führt zu einer gesteigerten Aufnahme von oxidiertem und acetyliertem LDL (oxLDL und acLDL), was zur Bildung von Cholesterin beladenen „Schaumzellen“ (foam cells) führt und Atherosklerose hervorruft. Die in Gewebsläsionen lokalisierten Makrophagen weisen mehrere Klassen von Scavenger- Rezeptoren (Klassen A-G) auf. Folgende Scavengerrezeptoren wurden als besonders wichtig für die Entstehung arteriosklerotischer Läsionen benannt: SR A1/11, CD 36, SR- B1, LOX-1, Macrosialin (CD68), SREC, CXCL 16 (SR-PSOX) (Greaves DR, 2001; Mehta et al., 2007; Moore and Freeman, 2006), (Tab. 2), (Abb. 5). Die Scavenger- Rezeptoren CD-36 und SR-A (CD 204) sind für 75- 90% der Cholesterinaufnahme in Makrophagen verantwortlich (Kunjathoor et al., 2002).

Scavenger Receptor	Class	Comment
Human SR-AI/II	A	exprimiert in "Schaumzellen", binden acLDL und oxLDL
Murine SR-AI/II	A	exprimiert in "Schaumzellen", binden acLDL und oxLDL
Human CD36	B	exprimiert in "Schaumzellen", bindet oxLDL
Murine CD36	B	bindet oxLDL, Knockout-Mäuse haben weniger Atherosklerose
Mouse SR-B1	B	vermittelt reversen Cholesterintransport
Human CLA-1	B	humanes Homolog von Nagetier SR-B1
Human CD68	D	bindet oxLDL, markiert Makrophagen in atherosklerotischen Plaques
Murine <i>Cd68</i> (macrosialin)	D	bindet oxLDL, markiert Makrophagen in atherosklerotischen Plaques
Human LOX-1	E	bindet oxLDL, exprimiert in Endothelzellen in Makrophagen
Human SR-PSOX	?	geklont von menschlichen Makrophagen

Tab. 2: Scavenger-Rezeptor- Arten in Anlehnung an (Greaves DR, 2001)

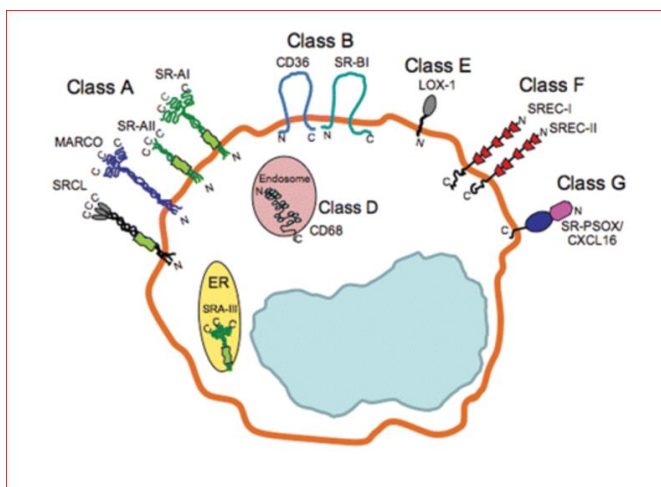


Abb. 5: Makrophagen Scavenger-Rezeptoren (Moore and Freeman, 2006)

Nach der Internalisierung von oxLDL und acLDL wird freies Cholesterin (FC) ins Zytosol abgegeben. Da FC äußerst zelltoxisch ist, wird es durch ACAT und NCEH (Neutrale Cholesterinester- Hydrolase) mit Cholesterinester im Gleichgewicht gehalten. Ein zweiter Mechanismus beruht auf dem Cholesterinefflux aus Makrophagen, der durch HDL angeregt wird (Tall et al., 2002). Üblicherweise beruht der Cholesterinefflux auf der Aktivierung nukleärer Rezeptoren wie PPAR γ durch FC, was zur Stimulation eines weiteren nukleären Rezeptors/ Transkriptionsfaktors (LXR) führt (Cascieri, 2002). Dieser Prozess stimuliert die Bildung von Cholesterintransportern wie ABCA1, ABCG1 und Apolipoprotein E (Apo E), was den Cholesterin-Efflux anregt (Demers et al., 2008), (Abb. 6).

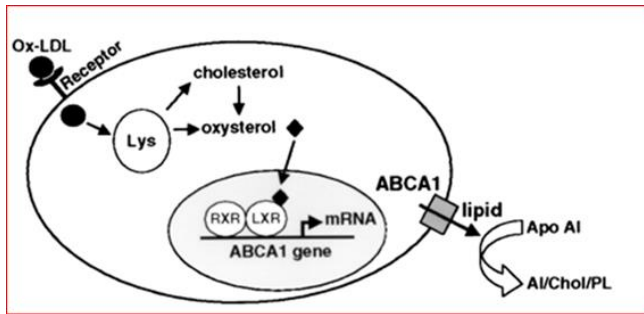


Abb. 6: Regulation der ABCA 1- Expression und des zellulären Cholesterineffluxes (Venkateswaran et al., 2000) (Copyright (2000) National Academy of Sciences, U.S.A.)

Bindung oxLDL/ acLDL an Oberflächenrezeptoren (CD 36, SR- A, SR- B1 usw.) → Internalisierung und Degradation in Lysosomen → Oxysterole (in oxLDL vorhanden oder intrazellulär aus Cholesterin hergestellt) wandern in den Nukleus → Aktivierung des LXR/ RXR- Heterodimers auf Zielgenen (z. B. ABCA- 1) → Efflux von Cholesterin und/ oder Phospholipiden → Bildung von Lipiddomänen → HDL- Entstehung.

2.2.3 ER-Stress in Makrophagen

Der ER- Stress ist ein Zustand, in dem eine Anhäufung unzureichend gefalteter Proteine („unfolded proteins“) im Lumen des ER vorliegt. Stresssituationen, wie z. B. Nahrungsmangel, oxLDL- Anhäufung, Thapsigargin- oder Tunicamycinbehandlung, Mangel an ATP, Mangel an Ca²⁺ und bei Virusinfektionen führen zu einer fehlerhaften Produktion von Proteinen. Um dem entgegen zu wirken, entwickelt die Zelle die sogenannte UPR (unfolded protein response), die das Überleben der Zelle und die Wiederherstellung der normalen Zellhomöostase zum Ziel hat. Die UPR wird durch drei auf der ER- Membran lokalisierten Rezeptoren vermittelt: PERK (Pancreatic ER-Kinase), ATF 6 (activating transcription factor 6), IRE- 1 (inositol requiring enzyme- 1). Bei normaler Zellhomöostase befinden sich diese Rezeptoren in einem inaktiven Zustand.

Bei normaler Zellhomöostase befinden sich diese Rezeptoren in einem inaktiven Zustand. Bei Akkumulation ungefalteter Proteine dissoziiert das GRP78- Chaperon von den genannten Rezeptoren, was zu deren Aktivierung und zur UPR führt (Schroder and Kaufman, 2005), (Abb. 7).

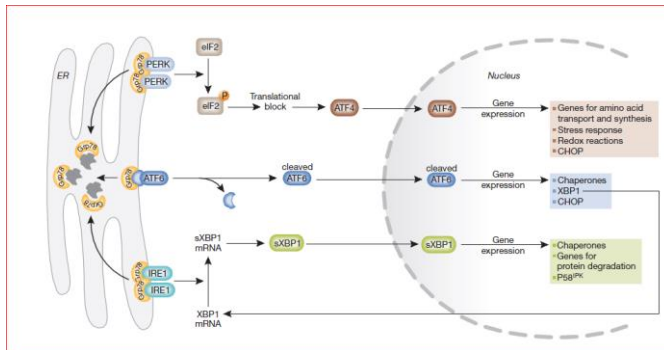


Abb. 7: ER- Stress und „unfolded protein response“ (Szegezdi et al., 2006) (reproduced with permission from EMBO)

ER- Stress stimuliert die drei ER- Stress- Rezeptoren des ER: PERK, ATF6 und IRE- 1. PERK phosphoryliert eIF2alpha, welcher die Proteintranslation verhindert und die eIF2alpha-unabhängige Translation von ATF- 4 begünstigt. Dadurch werden Chaperone wie GRP 78 aktiviert. ATF- 6 wird durch Proteolyse im Golgi- Apparat aktiviert. Eines der ATF- 6 Zielgene ist XBP1. Alternativ wird durch IRE- 1 ein

„Splicing“ von XBP1 mRNA bewirkt, was zur Aktivierung des XBP1- Transkriptionsfaktors führt. Alle drei UPR- Signalwege führen zur Blockade der Proteintranslation, zum Anstieg der Chaperon- Expression und zur Stimulierung der ER- assoziierten Proteinabbauwege.

Gelingt es der Zelle nicht die Zellhomöostase wieder herzustellen, induziert sie proapoptotische Signale, im Sinne des MAP- Kinase- Signalwegs, die durch JNK2 und P38- stimulierte CHOP getriggert werden, unter der Beteiligung von Scavenger- A- Rezeptoren (Devries-Seimon et al., 2005; Szegezdi et al., 2006; Tao et al., 2009), (Abb. 8). P38 spielt eine wichtige Rolle für die Zellmotilität, Transkription und den Chromatinumbau während JNK (c- Jun- N-terminal- Kinase) Transkriptionsfaktoren reguliert (Cowan and Storey, 2003).

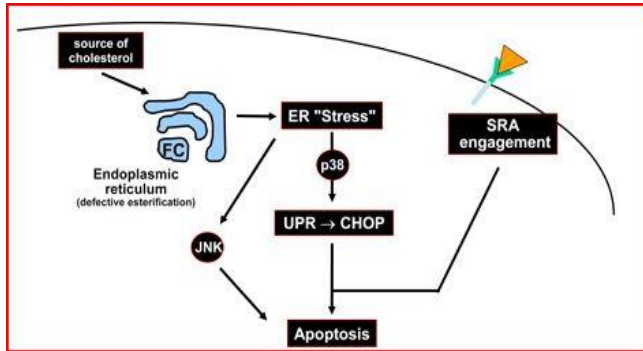


Abb. 8: Apoptose durch ER- Stress, MAPK und SRA- Beteiligung bei mit freiem Cholesterin- beladenen Makrophagen (Devries-Seimon et al., 2005)

FC induziert ER- Stress und führt zur Aktivierung von p38 und JNK. Aktiviertes p38 stimuliert den UPR- Effektor CHOP. Das Zusammenspiel zwischen p38- CHOP, JNK und SRA- Beteiligung generiert Apoptose. Auch Ac- LDL kann zur Stimulierung dieser proapoptotischen Signalwege führen, da es einen Liganden für den SRA- Rezeptor darstellt.

2.3 TRB3 (Tribbles homolog 3) (= SKIP3; NIPK3)

2.3.1 Bedeutung und Aufbau

Tribbles stellt eine Gruppe von Signalkaskaden-regulierenden Proteinen dar, welche durch das Gen TRB kodiert werden. Im Menschen findet man drei Arten dieser tribbles homologues Proteine (TRB1, TRB2, TRB3) (Hegedus et al., 2007). Das Tribbles- Gen ist auch bekannt, als SKIP3 (in Tumorzellen), FLD1, FLD2 bei Mäusen, TRB3 bei Drosophila, C5FW bei Hunden, NIPK bei Ratten und C8FW bei Menschen, wird aber jetzt einheitlich als TRB bezeichnet (Bowers et al., 2003; Klingenspor et al., 1999; Mayumi-Matsuda et al., 1999). TRB3- Gene befinden sich bei Menschen auf Chromosom 20 at P 13- P 12.2. Zudem wurde das kodierende Gen für tribbles auch in einzelligen Protozoen (*Monosiga ovata*) entdeckt. Das weist darauf hin, dass es sich bei

TRIBs entwicklungsgeschichtlich um alte Proteine handelt (Hegedus et al., 2006). Bei Menschen befindet sich tribbles in folgenden Geweben und Zellen: Fettgewebe, Skelettmuskeln, Neuronen, hepatischen Zellen, Knochenmark, Thymus, Herz, glatte Gefäßmuskelzellen, menschliche Nabelschnur, Prostata, Monozyten und Makrophagen (Cunard, 2013; Liu et al., 2010; Shang et al., 2009; Yacoub Wasef et al., 2006; Zhang et al., 2006). Darüber hinaus wird TRB3 im erkrankten Gewebe induziert, wie z. B. bei Adenokarzinomen des Kolons, bei hepatozellulärem Karzinom, Mamma- und Lungenkarzinomen (Bowers et al., 2003). Auch in osteoarthritischen Chondrozyten (Cravero et al., 2009) und atherosklerotischen Plaques konnte eine verstärkte Expression von TRB nachgewiesen werden (Deng et al., 2009).

Tribbles- Protein besteht aus 358 Aminosäuren und ist eine Art Nukleoprotein (Bowers et al., 2003). Es

ähnelt einer Serin- Threonin- Kinase und weist drei Domänen auf:

- die N- terminale Domäne („short domain“), mit einer hohen Serin- und Prolinkonzentration
- die „kinase- like- domain“ (auf der Mitte des Proteinmoleküls lokalisiert): diese Domäne unterscheidet sich von anderen typischen Kinasedomänstrukturen. Tribbles weist keine ATP- Bindungsstelle und keine Proteinkinaseaktivierungsdomäne auf. Folglich wurden die Tribbles- Proteine aufgrund des Fehlens von Kinasefunktionen zur Familie der Pseudokinasen gezählt (Bowers et al., 2003; Kanwar, 2010).
- die C- terminale Domäne: reich an Aminosäuren (Hegedus et al., 2007).

2.3.2 Funktion von TRB3/TRIB3

Großhans und Seher wiesen als Erste auf die Rolle von TRB3 als Mitoseinhibitor hin, indem es der Proteinphosphatase Cdc25/String bei *Drosophila* entgegenwirkt (Grosshans and Wieschaus, 2000; Seher and Leptin, 2000). Später konnte gezeigt werden, dass TRB3 diverse Signaltransduktionskaskaden steuert und somit in verschiedene Zellprozesse eingreift, z. B. in den Glukosestoffwechsel (Du et al., 2003), die endoplasmatische- Stress- Antwort (Selim et al., 2007; Yacoub Wasef et al., 2006), die Regulierung von Zellwachstum und- differenzierung (Hegedus et al., 2006; Sung et al., 2006) und den Lipidstoffwechsel (Wang et al., 2012). Durch diese Schlüsselrolle begünstigt TRB3 die Entwicklung von Krankheiten wie Krebs, Autoimmunleiden und Diabetes mellitus (Hegedus et al., 2006). Verschiede Zellstressoren wie ER- Stress, Hypoxie,

oxidativer Stress (oxLDL), Nahrungsmangel, Hyperglykämie und Störung der Kalziumhomöostase wiederum führen zu einer Zunahme von TRIB3- messenger- RNA- Expression (Yacoub Wasef et al., 2006).

Die Wirkung von TRIB3 auf die Entstehung von Diabetes mellitus wurde untersucht. Insulin wirkt über die Aktivierung der Schlüsselkinase Akt und fördert die Glykogensynthese, die Glukoseaufnahme in Muskelzellen und inhibiert die Glukoneogenese in der Leber (Weismann et al., 2011). TRIB3 nimmt Einfluss auf die insulingesteuerte Glukoseaufnahme, entweder durch die Hemmung von Akt2 oder durch Unterbindung der PPAR γ - Funktion. Weismann et al. konnte nachweisen, dass TRIB3 mit PPAR γ eine Protein- Protein- Bindung eingeht, was zur Inhibierung der Adipozytendifferenzierung bei Insulin- resistenten Ratten führte (Weismann et al., 2011).

Darüber hinaus begünstigen TRB3-Polymorphismen die Insulinresistenz. Insbesondere bei Q84R- missense- Polymorphismus bindet TRB3 an ATF4, was zur Abnahme der Insulinsekretion in Folge einer cAMP- Inhibierung beim Menschen führt (Liew et al., 2010; Prudente et al., 2009).

TRB3 ist auch an der Pathogenese anderer Erkrankungen beteiligt, wie bei atherosklerotischen Läsionen. Ein TRB3- Knockdown bewirkt eine Minderung der atherosklerotischen Belastung („atherosclerotic burden“), bedingt durch die verminderte Makrophagenmigration und -apoptose und eine Zunahme der Phagozytose. Dies führt zu einer Plaquestabilisierung durch Verdickung der fibrösen Kappe, einer Verbesserung des „cap- to- core“- Verhältnisses sowie einer Zunahme des Kollagengehalts und der Anzahl glatter Muskelzellen (Wang et al., 2012).

2.4 CHOP (C/EBP homologous protein)

CHOP ist ein stressinduzierbares Protein des Zellkerns und spielt eine wichtige Rolle beim programmierten Zelltod (Ohoka et al., 2005). CHOP wird der C/EBP Familie der Transkriptionsfaktoren zugerechnet, die unterschiedliche Prozesse wie die Immunfunktion, Zelldifferenzierung und -proliferation reguliert (Loinard et al., 2012). Erstmals wurde die Expression nach UV-Bestrahlungen und unter der alkylierenden Substanz Methylmethansulfonat (MMS) beschrieben und das Gen wurde GADD 153 („growth arrest and DNA damage inducible gene 153“) genannt (Libby et al., 1996). GADD-Gene (GADD 34, GADD 45, GADD 153) gehören zur einer Gruppe von Genen, die durch genotoxische Stressfaktoren und durch wachstumshemmende Signale exprimiert werden; untereinander zeigen sie aber keine Ähnlichkeiten.

CHOP Gene beinhalten zwei funktionelle Domänen: Eine „N- terminal transcriptional activation domain“ und eine „C- terminal basic-leucine zipper (bZIP) domain“ (Oyadomari and Mori, 2004), (Abb. 9).

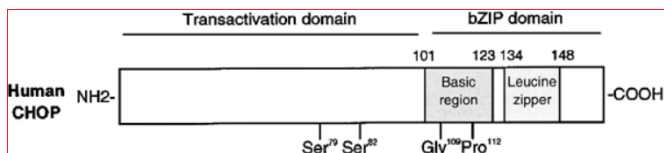


Abb. 9: Domänenstruktur von CHOP (Oyadomari and Mori, 2004).

CHOP besitzt eine N- terminale putative Transaktivierungsdomäne und eine C- terminale bZIP Domäne. Letztere beinhaltet eine DNA- Bindungsstelle (Basic region) und eine „Leucine- zipper Dimerisationsdomäne“. Die Serineanteile in der Transaktivierungsdomäne werden mittels p38 MAP Kinase phosphoryliert, was eine verstärkte transkriptionale Aktivität zur Folge hat (Oyadomari and Mori, 2004).

CHOP wird unter normalen Bedingungen nur in geringer Menge exprimiert. In Zellstresssituationen kommt es zu einer hohen Expression und seiner Anhäufung im Zellkern (Loinard et al., 2012). Zu

den Stressoren mit Stimulation von CHOP werden gerechnet: Aminoacidmangel, DNA-Schädigungsfaktoren wie UV- Licht, ER-Stressfaktoren wie Glukosemangel, Tunicamycin, Thapsigargin und Dithiothritol. Wegen seiner empfindlichen Reaktion auf ER- Stress und weniger auf DNA- Schädigungen wird CHOP als ER- Stress Marker bezeichnet. Die ER- Stress-Antwort beruht auf dem Transkriptions- und Aktivierungsprogramm von drei ER- Stress-Transduktoren. Diese sind PERK, ATF 6 und Ire 1. Unter normalen Umständen sind diese Faktoren an Bip (Binding Immunoglobulin Protein oder GRP 78 = glucose regulated protein 78) gebunden, was deren Transport zum Golgi- Apparat verhindert. Bei ER- Stress bindet Bip an „unfolded protein“ und führt zur Aktivierung der zuvor genannten drei ER- Stress- Transduktoren. Die Aktivierung von PERK bewirkt eine Transkriptionsinduktion von ATF 4, was gemeinsam mit den zwei anderen

aktivierten Transduktoren zur Aktivierung von CHOP führt. Die Überladung der Zelle mit CHOP-Protein führt zum Zellzyklusarrest und zur Apoptose, ausgelöst durch die Inhibierung von Bcl-2 Proteinen (pro survival protein) und die Überexpression von Bcl 2- Blockern, was die Translokation von BAX- Proteinen vom Zytosol zur mitochondrialen Membran induziert (Oyadomari and Mori, 2004). Zudem induziert CHOP über die Aktivierung weiterer Zielgene apoptotische Mechanismen, wie die Freisetzung zellulärer Gluthatione oder die überschießende Produktion reaktiver O₂- Verbindungen (z. B. NO) (McCullough et al., 2001). Reaktive Sauerstoffverbindungen aktivieren p53 und JNK-MAP- Kinase, was zu Strukturänderungen und zur Translokation von BAX zur mitochondrialen Membran führt (Gotoh et al., 2004).

2.5 BAX (Bcl-2- associated X protein)

BAX gehört zur Bcl-2 (B- cell lymphoma 2) Familie, deren Proteine die Steuerung von Zellüberleben bzw. Zelltod wesentlich beeinflussen (Basu and Haldar, 1998). Das BAX- Protein wurde als erstes Bcl-2 Protein identifiziert (Oltvai et al., 1993). BAX gilt als Co- Faktor und Downstream-Produkt von p53 und agiert als Pro-Apoptosemarker. Innerhalb der Bcl-2 Familie wirken BAX, BAK, BOK, BAD, BIK proapoptotisch im Gegensatz zu anderen Proteinen der Bcl-2 Familie, die antiapoptotisch agieren (Basu and Haldar, 1998), (Abb. 10).

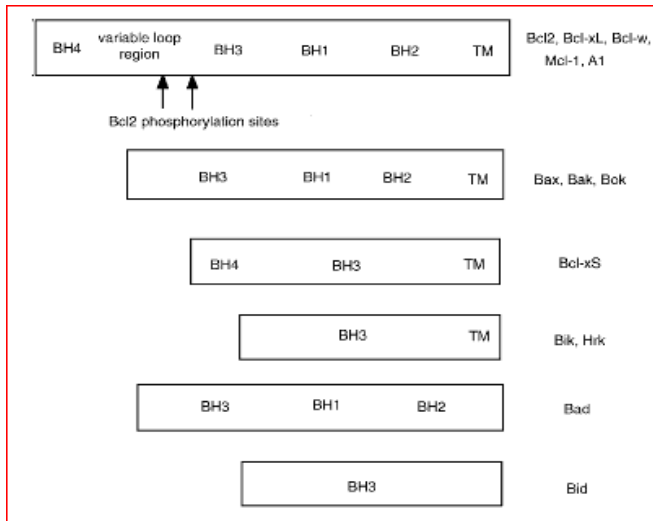


Abb. 10: Struktur von Bcl2- assoziierten apoptotischen Regulatoren (Basu and Haldar, 1998).

BH = Bcl2 homology domain; TM = transmembrane region.

Die proapoptisch wirkende Gruppe der BAX, BOK, BAK Proteine ist durch das Fehlen der „BH4 Domäne“ charakterisiert. Unter normalen Zellbedingungen ist das BAX Protein frei in inaktiver Form im Zytosol vorhanden und ist

mit Bcl-2 assoziiert. BAX bildet entweder ein Homo- (BAX - BAX) oder ein Hetero (BAX - Bcl-2)- Dimer. Im Falle eines Bcl-2 Exzesses dominiert die Menge des Hetero- Dimers, was das Überleben der Zelle begünstigt. Bei einer Überexpression von BAX überwiegen die BAX-Homo- Dimere, was die Anfälligkeit der Zelle für Apoptose erhöht (Basu and Haldar, 1998; Oltvai et al., 1993).

BAX wird auch durch verschiedene andere Faktoren beeinflusst, wie CHOP, das unter zytotoxischem Stress die Downregulation von Bcl-2 bewirkt und ähnlich wie TRB3 und JNK Strukturänderungen an BAX und seine Translokation zur äußeren mitochondrialen Membran hervorruft, (Humphrey et al., 2010; Szegezdi et al., 2006), (Abb. 11).

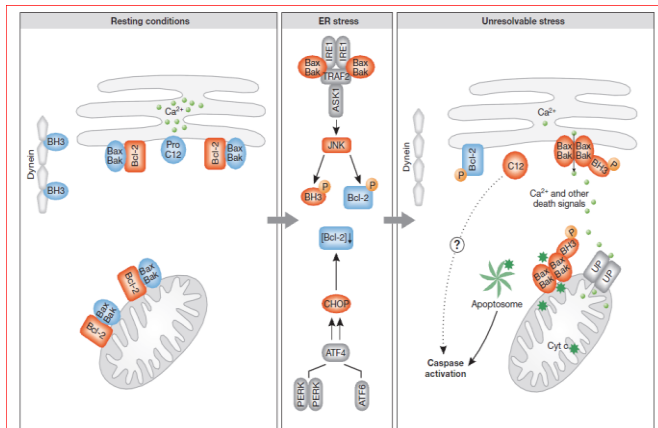


Abb. 11: Proteine der Bcl2 Familie in ruhenden Zellen und unter ER- Stress- Bedingungen (Szegezdi et al., 2006) (reproduced with permission from EMBO).

Unter ruhenden Bedingungen sind das proapoptotische Bax und Bak durch die Interaktion mit Bcl2 inaktiv. Sowohl JNK als auch CHOP wirken dem antiapoptotischen Effekt von Bcl2 („prosurvival“) entgegen. CHOP blockiert die Expression von Bcl2 während JNK dessen Phosphorylierung bewirkt. JNK trägt auch zur Phosphorylierung von Bim bei, was zu dessen Freisetzung aus dem Zytoskelett und dessen Aktivierung führt. Diese Änderungen gemeinsam führen zur Aktivierung von Bax und Bak und deren Translokation vom ER zur äußeren mitochondrialen Membran. Über die Freisetzung von Cytochrom C kommt es zur Aktivierung von Caspasen, die eine Apoptose einleiten.

Blaue Markierung zeigen inaktive und rote aktive Moleküle.

Während Akt die Aufnahme und Phosphorylierung von Glukose reguliert und dadurch die Aktivierung von BAX verhindert, und infolgedessen seine proapoptotischen Ereignisse hemmt, wirkt TRB3 inhibierend auf Akt und somit aktivierend auf BAX (Du et al., 2003; Rathmell et al., 2003). Ähnlich wirkt P53 stimulierend auf BAX und begünstigt dadurch den durch MDA (Microtubule-damaging agent) vermittelten Zelltod. Andererseits bewirkt P53 bei genotoxischem Stress (DNA-Damage) eine Herunterregulierung von TRB3 (Yamaguchi et al., 2004).

Durch ER- Stressbedingungen wird BAX vom Zytosol zur äußeren Membran der Mitochondrien transferiert und verursacht dort die Öffnung der „mitochondrial voltage- dependant anion channel“ (VADC) (Shi et al., 2003; Wolter et al., 1997) bzw. bildet „mitochondrial apoptosis- induced channels“ (MAC) in der Außenmembran der Mitochondrien, was zur Freisetzung von Cytochrom C und anderen

proapoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien führt (Peixoto et al., 2011). Die verstärkte mitochondriale Membranpermeabilität aktiviert Caspasen, die zum Zelltod führen können (Szegezdi et al., 2006).

2.6 Fragestellung dieser Arbeit

Obwohl die Beziehung zwischen Cholesterinaufnahme, Schaumzellbildung und Apoptose von Makrophagen bekannt ist, konnten bisher die Mechanismen auf genetischer Ebene nicht ausreichend geklärt werden. Da TRB3 in Makrophagen vorhanden ist und diverse Zellprozesse reguliert, stellte sich nun die Frage, ob eine direkte Beziehung zwischen Genaktivität und Cholesterinaufnahme besteht.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von TRB3 auf die Cholesterinaufnahme in THP- 1- Zellen und Makrophagen zu klären.

Schritte, die zur Beantwortung der Fragestellung beitragen, umfassten folgende Untersuchungen und Fragestellungen:

- Wieviel TRIB3 in THP-1- Zellen und differenzierten Makrophagen auf mRNA- und Proteinebene vorhanden ist?
- Ob und inwieweit ein TRB3- Knockdown Einfluss auf die Cholesterinaufnahme dieser beiden Zellarten nimmt?
- In welchem Ausmaß eine Stimulation mit einem ER- Stressor (Thapsigargin) eine Änderung in der Cholesterinaufnahme sowohl in normalen also auch in TRB3- Knockdown- Zellen bewirkt?
- Inwiefern ein Knockdown oder eine Stimulation von TRB3 eine Interaktion zu CHOP und BAX aufweist?

3 Zellrekrutierung, Material und Methoden

3.1 Zellrekrutierung

3.1.1 Zelllinie THP-1

Die THP-1- Zellen wurden von der Firma Cell Lines Service/ Eppelheim Germany erworben. Sie stammen aus dem Blut eines einjährigen männlichen Patienten mit akuter monozytärer Leukämie. Die Zellen wurden mit flüssigem Stickstoff konserviert und geliefert.

3.2 Material

3.2.1 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Firma
Photometer	Photometer	Eppendorf
	Nanodrop 2000c	Thermo Scientific
Zentrifugen	Rotana/RPC	Hettich
	ThermoScientific	Heraeus (Buckinghamshire, UK)
	Biofuge Fresco	Heraeus (Buckinghamshire, UK)
	Megafuge 1.0 R	Heraeus (Buckinghamshire, UK)
	Mini Zentrifuge „Sprout“	Omnilab (Bremen, Deutschland)
	Spectrafuge Minicentrifuge	Labnet (Oakham, UK)

Brutschrank	Forma Series 3111	Thermo Scientific (Langensfeld, Deutschland)
Blot- Apperatur	Trans-Blot SD Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Röntgenfilm- prozessor	Ecomax X-Ray Film Processor	Protec (Oberstfeld, Deutschland)
Elektrophorese- kammern	Electrophorese Joule Box	Stratagene (Heidelberg, Deutschland)
	Mini Protean Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Heizblöcke	Thriller	PeqLab (Erlangen, Deutschland)
	Techne Dri- Block DB2D	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

Magnetrührer	Bio Magnetic Stirrer MMS- 3000	Biosan, (Riga, Lettland)
Mikrobiologische Sicherheitswerk- banken	MSC Advantage 1.2 MSC Advantage 1.8	Thermo Scientific (Langensfeld, Deutschland) Thermo Scientific (Langensfeld, Deutschland)
Mikroskop	Leica DM IL Axioskop 2 plus	Leica (Wetzlar, Deutschland) Zeiss
PCR - Gerät	Mastercycler gradient	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
PH-Meter	InoLab pH 720	WTW (Weilheim, Deutschland)
Mikrowelle	Quick Cookmate	Daewoo (Berkshire, UK)
Präzisionswaage	SBA 32	Scaltec (Göttingen, Deutschland)

Schüttler	Rotary shaker KS10 swip + TH10 Taumelschüttler: Polymax 1040	Edmund Bühler GmbH (Tübingen, Deutschland) Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Realtime PCR Gerät	CFX96 Real- Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Spectralphotometer	Nanodrop 2000	Thermo Scientific (Langenselbold, Deutschland)
Ultraschallbad	Sonorex RK100H	Bandelin electronic (Berlin, Deutschland)
Vortexer	MS1 Minishaker	IKA (Staufen, Deutschland)

Tab. 3: Geräte

3.2.2 Chemikalien, Kits, Antikörper, Sonden und Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von der Firma Sigma-Aldrich, Gibco life technologies (invitrogen), Qiagen bezogen und waren vom Reinheitsgrad p.a.. Davon abweichende Bezugsquellen werden im Text erwähnt.

Material Bezeichnung	Firma
Fuji Super RX Röntgenfilme	Fujifilm Europe GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
Aqua dest.	Braun, Deutschland
Tween 20 Biochemika	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Gene Pulser Cuvettes 0,4cm electrode gab, 30% Acrylamid/ Bis Solution, Temed, Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)

Glycerin, Hefeextrakt, Tris	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Hybond-ECL, ECL Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare (München, Deutschland)
L-Glutamin, BenchMark Prestained Protein Ladder, Trypan blau	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Taq Man Gene Expression Master Mix	Appliedbiosystems, Invitrogen, Deutschland
Fatty acid free Albumin Bovine Serum, BCA Solution, 4% Kupfersulfat	Merck (Darmstadt, Deutschland), Novagen (Germany)
Foetal Bovine Serum	PAN Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland)

<p>DPBS, RPMI 1640, APS, Bromphenolblau, Ethanol , EDTA, Glycin for electrophoresis, Trypsin-EDTA Solution (1x), Accutase, 2-Mercaptoethanol, Methanol, Ponceau-S Solution, Phosphate Buffered Saline, BSA, Nitrozellulose, SDS</p>	<p>Sigma- Aldrich (Steinheim, Deutschland)</p>
<p>Cholesteryl BODIPY FL C12, C 3927 MP</p>	<p>Invitrogen Life technologies molecular probes (USA)</p>
<p>Lipofectamine RNAiMAX Reagent</p>	<p>Invitrogen, Life technologies</p>
<p>FlexiTube siRNA 5 nmol AllStars Negative Control siRNA (5 nmol)</p>	<p>Quiagen (Hilden, Deutschland)</p>

Phorbol 12-myristate 13-acetate	Sigma- Aldrich (Steinheim, Deutschland)
OPTI- MEM 1	Gibco by Life technologies
Thapsigargin sc-24017	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (California, USA)
TRB-3 (N-terminal) rabbit 1:1000	Sigma- Aldrich (Germany)
ECL Peroxidase labeled anti-rabbit AK 100ul 1:1000	GE Healthcare UK, Amersham
TRB-3 193T lysate sc-114588	Santa Cruz
QIAshredder, QuantiTect Reverse Transcription Kit	QIAGEN GmbH (Hilden, Deutschland)

<u>Sonden:</u> Actin, Beta HS- 9999903_M1 TRIB3 HS01082394_M1 DDIT3 HS 01090850_ M1 BAX HS 99999001_M1	Appliedbiosystems, Invitrogen Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt
Cellstar tubes	Greiner bio one
Küvetten	Eppendorf
4% Cupric Sulfate, BSA Protein Standard	Novagen, Merck Milipore, Deutschland

Bench Mark Prestained Protein Ladder	Invitrogen, Deutschland

Tab. 4: Chemikalien, Kits, Antikörper, Sonden, Verbrauchsmaterialien

3.2.3 Puffer Lösungen

Die Zusammensetzung der Pufferlösungen wird für die einzelnen Experimente im Methodenteil näher ausgeführt.

3.3 Methoden

3.3.1 THP-1- Kultivierung

Im Stickstoff konservierte THP-1- Zellen wurden in RPMI- Medium (unter Zusatz von 20% FCS/

Fetales Kälber Serum und 5% L- Glutamin) aufgetaut und in T 75er Flaschen in Kultur gebracht. Im Brutschrank wurde das Wachstum bei 37°C angeregt (inkubiert). Dabei wurde an jedem zweiten Tag ein Mediumwechsel vorgenommen, mit dem Ziel eine ausreichend hohe Zellanzahl für das spätere Aussähen zu erreichen. Bei der Aussaat wurde auf eine konstante Zellkonzentration geachtet, indem 1 Mio. THP-1- Zellen in jeweils 2 ml RPMI- Medium in einem well einer 6- well Platte ausgesät wurden. Die nachfolgend beschriebenen Experimente an den THP-1- Zellen wurden jeweils in den wells durchgeführt.

3.3.2 Differenzierung von THP-1- Zellen zu Makrophagen („macrophage-like- cells“)

Um Monozyten (THP-1- Zellen) zu Makrophagen zu differenzieren wurde den oben genannten wells

PMA (12- phorbol- myristate- acetate) zugeführt und untersucht, welches die optimalste Konzentration (200ng, 250ng, 300ng, 350ng,400ng oder 450ng) und die wirksamste Inkubationszeit (24h, 48h oder 72h) ist, bei Verwendung einer Stammlösung von 1 mg/ml PMA. Die Entwicklung von THP-1- Zellen zu Makrophagen wurde mikroskopisch überprüft (Abb. 12, 14); im Gegensatz zu THP-1- Zellen weisen Makrophagen eine dendritische, polymorphe und keine abgerundete Struktur auf und gruppieren sich nicht in Haufen.

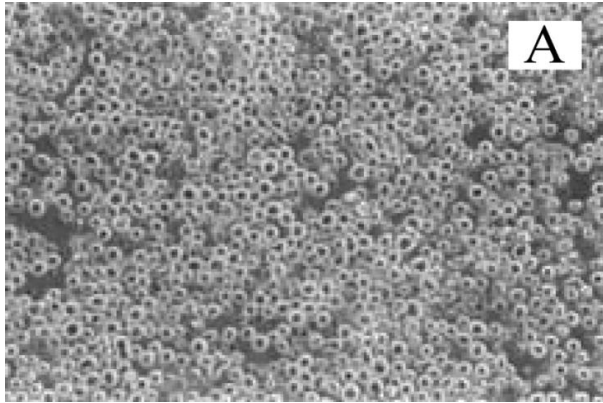


Abb. 12: THP-1- Zellen im Phasenkontrastmikroskop (x20) Hayden JM., Brachova L., Higgins K., Obermiller L., Sevanian A., Khandrika S. and Reaven PD (2002) Induction of monocyte differentiation and foam cell formation in vitro by 7-ketocholesterol. *J Lipid Res.* 43(1): 26-35

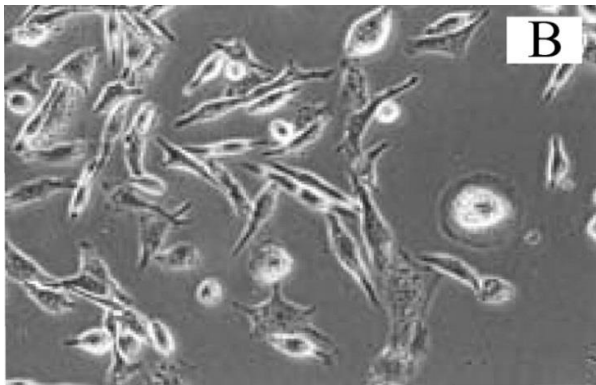


Abb. 13: Makrophagen im Phasenkontrastmikroskop (x20) Hayden JM., Brachova L., Higgins K., Obermiller L., Sevanian A., Khandrika S. and Reaven PD (2002) Induction of monocyte differentiation and foam cell formation in vitro by 7-ketocholesterol. *J Lipid Res.* 43(1): 26-35

3.3.3 Zellzählung

Um konstante Zellkonzentrationen bei der Aussaat zu erreichen ist eine vorausgehende Zellzählung erforderlich. Diese beruht auf folgendem Vorgehen:

Die Zellsuspension einer T 175er Flasche wird in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen umgefüllt und daraufhin zentrifugiert (für 5 min bei 700 rpm) und der Überstand abpipettiert. Zu dem Zellpellet wird frisches RPMI Medium (z.B. 10 ml) addiert und vorsichtig resuspendiert. Die Suspension wird dann mit Trypanblau, entsprechend der Menge an Zellpellet, in einem Verhältnis von 1:5 oder 1:10 verdünnt. Trypanblau dringt in abgestorbene Zellen ein und färbt diese blau während lebende Zellen keine Färbung zeigen. In einer Neubauer Zählkammer wird die Zellzahl pro Zählraster (insgesamt 4, jeweils 1 x 1 mm Fläche) bestimmt und die vier Werte addiert, woraus sich die

Gesamtzellzahl der Zählkammer ergibt. Die Gesamtkonzentration der Zellen im Zentrifugenröhrchen wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Gesamtzellzahl} / 4 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10000 = \text{Zellen gesamt} / \text{ml}$$

Um die gewünschte Zellkonzentration von 1 Mio.Zellen/ 2 ml zu erreichen, wird das Gesamtgemisch entsprechend eines berechneten Verdünnungsfaktors hergestellt und auf die wells ausgesät.

3.3.4 Knockdown TRB3- mRNA in THP-1- Zellen und differenzierten Makrophagen (Abb. 14, 15)

Zur Durchführung eines Knockdowns wurde die chemische Variante mit Lipofectamine gegenüber der mechanischen durch Elektroporation präferiert,

um die empfindlichen THP-1- Zellen und differenzierten Makrophagen einer möglichst geringen Stresssituation auszusetzen.

Das „TRB3- silencing“ erfolgte in Anlehnung an das Knockdownprotokoll „Lipofectamine RNAiMAX Reagent, reverse Knockdown“ der Firma Invitrogen unter angepassten Voluminerhältnissen. Der „reverse Knockdown“ erwies sich hierbei als erfolgreicher gegenüber dem „forward Knockdown“ Protokoll, da die Zellen insgesamt, aufgrund der kürzeren Gesamtinkubationszeit, in geringerer Zahl apoptotisch wurden und die Menge von 1 Mio ausgesäten Zellen direkt als konstante Ausgangsbasis für den Versuchsbeginn verwendet werden konnte.

Sowohl für THP-1- Zellen als auch für differenzierte Makrophagen wurde das Transfektionsgemisch auf gleiche Weise

vorbereitet, indem 100 pmol (entsprechend 5 μ l) siRNA (für Versuchsreihe: TRB-3 siRNA, für Kontrollreihe: TRB-3 Kontroll- siRNA) in ein mit 500 μ l Opti- MEM I Medium vorbereitetes Eppendorfröhrchen zugegeben wurde (Ansatz pro well). Nach einmaligem, vorsichtigem Schwenken des Eppendorfröhrchens wurde noch 5 μ l Lipofectamine RNAi MAX Reagent addiert. Nach 15- minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (21°C) wurde das gesamte Gemisch in ein well gegeben (d.h. Ansatz pro well). Abschließend wurde die 6- well Platte für 48h im Brutschrank (37°C) inkubiert.

Da bei THP-1- Zellen keine Differenzierungszeit notwendig ist, hätte das Transfektionsgemisch aus theoretischen Überlegungen sofort dazugegeben werden können. Aus Gründen vergleichbarer zeitlicher Untersuchungsbedingungen wurde jedoch das Tranfektionsgemisch erst nach 6h Inkubationszeit addiert, da bei Makrophagen nach

vorausgegangener Austestung die Differenzierung nach 6h (vs. 24h und 48h) ausreichend war. Zudem wurde dabei berücksichtigt, dass bei längerer Inkubationszeit die Differenzierung der Zellen zwar fortgeschrittener (Mehrheit der Zellen komplett differenziert) wäre, jedoch würde ein erst dann einsetzender Knockdown (festgelegte Dauer: 48h) auch eine längere Gesamtinkubationszeit mit sich bringen, was mit einer erhöhten Belastung der Zellen einhergehen könnte.

Abb. 14: Schema Knockdown in THP-1- Zellen

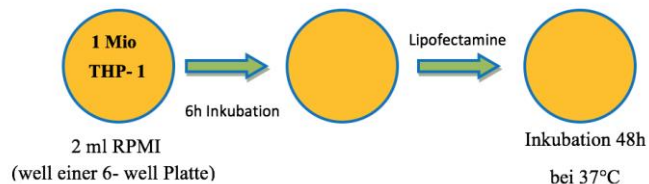
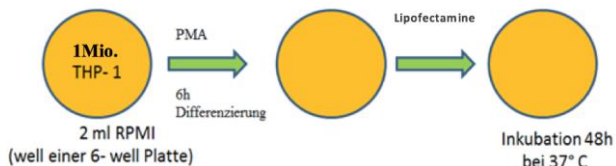


Abb. 15: Schema Knockdown in differenzierten Makrophagen



3.3.5 Versuchsreihe PCR: unbehandelte und Thapsigargin stimulierte Zellen ± siRNA (Abb. 16, 17)

Aufgrund schwach ausgeprägter Stimulationsergebnisse von TRB3 unter oxLDL Zugabe (Kontrolle: LDL) folgte ein neuer Stimulationsversuch mit dem ER- Stress Induktor Thapsigargin.

Folgende Thapsigarginkonzentrationen: 0,5 uM, 1 uM, 1,5 uM, 2 uM und 5 uM wurden eingesetzt um eine ausreichende Stimulation auf RNA- Ebene bei möglichst niedrigem ER- Stress zu erreichen. Zudem tritt die Wirkung einer Thapsigargin Stimulation äußerst rasch ein und bewirkt ER- Stress, sodass eine Inkubation nur für einen Zeitraum von 6h durchgeführt wurde. Da ein Knockdown über einen längeren Zeitraum stattfinden muss, wurde bei Knockdown Versuchsansätzen mit zusätzlicher

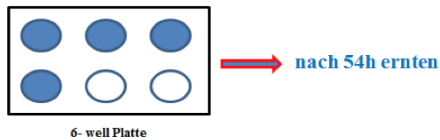
Thapsigargingabe, die Induktion nachgeschaltet, um die Stimulation eines Knockdowns und nicht den Knockdown einer Stimulation darzustellen.

Für die real time Analyse wurden je Versuchsansatz (A- E) für jede Zellreihe vier wells zweier 6- well Platten mit 1 Mio. Zellen ausgesät (8 Samples; n=8). Die real time PCR- Untersuchungen wurde je Probe als Duplikat angelegt und die Werte daraus ermittelt:

- A) Unbehandelte Zellen (Kontrolle)
- B) Zellen mit TRB3- siRNA
- C) Zellen mit unterschiedlichen Thapsigarginkonzentrationen
- D) Zellen mit Knockdown (siRNA) unter 1,5 uM und 5 uM Thapsigargin
- E) Zellen mit TRB 3- Kontroll- siRNA

Abb. 16: THP-1 Versuchsreihe PCR: Unbehandelte und Thapsigargin stimulierte Zellen \pm siRNA. Schema THP-1: 1 Mio. Zellen/ 2 ml (pro well)

A) THP- 1: ohne Thapsigargin, ohne siRNA



Unbehandelte THP-1- Zellen (1 Mio. Zellen pro well) wurden nach einer Inkubation von 54h (bei 37°C) geerntet.

B) THP- 1: ohne Thapsigargin, + siRNA



Die THP-1- Zellen wurden für 6h inkubiert und anschließend transfiziert (siRNA). Die Inkubationszeit für den Knockdown betrug 48h; danach wurden die Zellen geerntet.

C) THP- 1: mit jeweils 0,5uM/ 1uM/ 1,5uM/ 2uM/ 5uM Thapsigargin



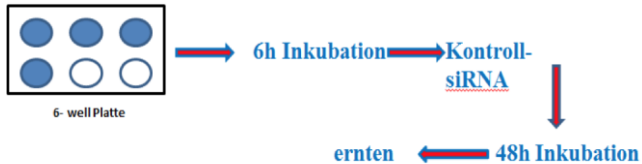
Nach 48- stündiger Inkubation (37°C) der Zellen wurde jedes well mit der entsprechenden Konzentration an Thapsigargin versetzt (d.h. jeweils ein neuer Ansatz mit zwei Platten je vier wells für jede der Thapsigarginkonzentrationen). Geerntet wurde nach einer weiteren Inkubationszeit von 6h.

D) THP- 1: jeweils 1,5uM Thap. + siRNA und 5uM Thap. + siRNA



Nach einem Knockdown von 48h erfolgte eine TRB3 Stimulation mit Thapsigargin, woraufhin die Zellen nach weiteren 6h Inkubationszeit geerntet wurden.

E) THP-1: ohne Thapsigargin, mit Kontroll siRNA



Die THP-1- Zellen wurden für 6h inkubiert und anschließend mit Kontroll- siRNA versetzt, wobei die Inkubationszeit für den Knockdown 48h betrug bevor die Zellen geerntet wurden.

Abb. 17: Makrophagen Versuchsreihe PCR: Unbehandelte und Thapsigargin- stimulierte Zellen ± siRNA. Schema differenzierte Makrophagen: 1 Mio. Zellen/ 2ml (pro well)

Bei der Makrophagenversuchsreihe wurde im Wesentlichen auf gleiche Weise wie bei den THP-1- Zellen vorgegangen, jedoch wurde jeweils als erster Schritt eine Differenzierung der THP-1-

Zellen mit PMA über 6h vorgeschaltet. In der Folge war der Versuchsablauf ähnlich und es wurde auf eine konstante Zeitspanne eines 48h Knockdowns und einer 6h Thapsigargin-Stimulation geachtet.

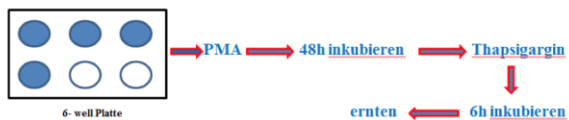
A) THP-1: ohne Thapsigargin, ohne siRNA



B) THP-1: ohne Thapsigargin, + siRNA



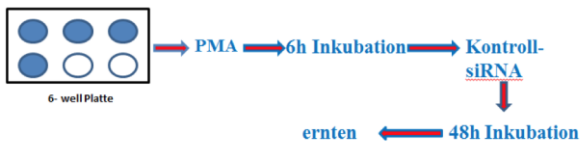
C) THP-1: mit jeweils 0,5uM/1uM/ 1,5uM/ 2uM/ 5uM Thapsigargin



D) THP-1: jeweils 1,5 μ M TG. + siRNA und 5 μ M TG + siRNA



E) THP-1: ohne Thapsigargin, mit Kontroll- siRNA



3.3.6 Ernten der THP-1- Zellen bzw. differenzierten Makrophagen und Vorbereitung für die rt- PCR

THP-1- Zellen: Der Inhalt eines wells wurde jeweils in ein Eppendorfröhrchen umpipettiert und zentrifugiert (7000 rpm über 5 min) und der Überstand (Medium) verworfen. Das verbliebene Zellpellett wurde bei -20°C bis zur Weiterverwendung eingefroren.

Differenzierte Makrophagen: Da es sich bei Makrophagen um adhärenente Zellen handelt, wurde jeweils das Medium eines wells abpipettiert und verworfen um Rest- THP-1 Zellen zu eliminieren. Danach wurde 2 ml frisches RPMI Medium in das well dazugegeben und nachfolgend die Zellen durch einen Zellschaber vom Boden abgelöst. Es folgte die Umpipettierung des Wellinhalts in ein Eppendorfröhrchen. Diese wurde zentrifugiert (7000rpm über 5 min) und das Zellpellett nach Entfernung des Überstandes bei -20°C eingefroren.

3.3.7 Ernten der THP-1- Zellen bzw. differenzierten Makrophagen und Vorbereitung für den Western Blot (Proteinisolation)

THP-1- Zellen: Wie bei der Vorbereitung für die rt-PCR wurde in gleicher Weise vorgegangen, lediglich das verbliebene Zellpellett mit 100 ul

RIPA- Puffer versetzt, um Zellen zu lysieren ohne Proteine zu degradieren. Danach wurde dieses RIPA- Zellgemisch zur Proteinbestimmung verwendet.

Differenzierte Makrophagen: In Anlehnung an die Ernte beim rt- PCR Schema wurde in gleicher Weise vorgegangen, jedoch am Ende zusätzlich 100 ul RIPA- Puffer dem Zellpellett beigemischt und anschließend Protein bestimmt.

RIPA- Puffer Zusammensetzung:

25 mM Tris/HCl pH 7,6

150 mM NaCl

1 % Natriumdeoxycholat

1% Igepal CA630

0,1% SDS

1 Tablette Complete Mini Proteaseinhibitor

(Roche) pro 10 ml

3.3.8 Molekularbiologische Methoden

3.3.8.1 RNA- Isolierung

Als Standardmethode zur Isolierung von RNA bis zu 100 µg wurde ein Kit der Firma Qiagen (RNeasy Mini Kit) verwendet. Die für die Untersuchungen herangezogenen Zellpellets wurden mit β -Mercaptoethanol versetztem Lyse- RLT- Buffer resuspendiert, was zur Inaktivierung der RNAsen führt. Das Lysat wurde in QiaShreddern zentrifugiert und homogenisiert. Das homogenisierte Filtrat wurde in Röhren mit Silika- Gel- Membranen überführt, was zur Adhäsion der RNA an diese Membranen führte. Durch zahlreiche Waschschrte und erneute Zentrifugationen wurden unerwünschte

Bestandteile entfernt. Die Ablösung der RNA aus der Membran erfolgte durch 40 µl RNase freies H₂O. Die gewonnene RNA wurde bis zur c- DNA Umschreibung bei - 80° gelagert.

3.3.8.2 Messung der RNA-Konzentrationen

Unter Einsatz eines Micro- Volume UV- Vis-Spectrophotometers (Nanodrop 2000) wurde die RNA- Konzentration photometrisch gemessen in einem Probevolumen von 2 µl. Beruhend auf dem Lambertschen Gesetz wurde die Absorption während Lichtexposition gemessen, wobei die Lichtextinktion zur Konzentration der absorbierenden Verbindung direkt proportional ist.

Lambertsches Gesetz:

$$E = \varepsilon \times c \times d$$

E = Extinktion

ϵ = wellenabhängiger E- Koeffizient (ng \times cm/ ul)

c = Nukleinsäurekonzentration (ng/ ul)

d = Schichtdicke (cm)

3.3.8.3 Umschreibung von RNA in cDNA (reverse Transkriptase)

Für die Umschreibung von RNA in komplementäre DNA (Voraussetzung für die Messung der RNA mittels rt- PCR) wurde das QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) benutzt. Für jede Untersuchung wurden 500ng RNA mit 2ul gDNA-Wipeout- Buffer gemischt und mit RNase- freiem H₂O auf ein Gesamtvolumen von 14ul aufgefüllt. Um die Sekundärstruktur der RNA aufzulösen, wurde diese Mischung über 5 Minuten bei 42° im Mastercycler inkubiert. Nach sich anschließender Abkühlung auf 4° wurde 1 ul RT Primer Mix, 1 ul

Quantiscript Reverse Transkriptase und 4 µl Quantiscript RT- Buffer hinzugegeben und dann erneut im Mastercycler bei 42° über 15 Minuten inkubiert und somit cDNA gebildet. Schließlich wurde die Reverse Transkriptase- Aktivität bei 95° über 3 Minuten geblockt

3.3.8.4 rt-PCR (real time Polymerase chain reaction)

Die rt- PCR ist eine sensitive Methode, basierend auf der Polymerasekettenreaktion, zur Vervielfältigung spezifischer DNA- Abschnitte in vitro, um die Erkennung kleinster DNA- Mengen quantitativ zu ermöglichen. Die Polymerasen benötigen zur Vervielfältigung der DNA- Moleküle die für die DNA- Synthese notwendigen Nukleotide Adenin, Thymin, Cytosin und Guanin. Desweiteren wird ein DNA- Stück (Primer) benötigt, an das sich die Nukleotide binden.

Drittens ist eine Matrize (längeres DNA- Molekül = Template) für den Aufbau eines neuen DNA-Stranges notwendig. Sind die drei Voraussetzungen gegeben, können Replikate dieser DNA hergestellt werden. Entsprechend gibt es auch RNA-Polymerasen, welche vor allem für die Bildung von mRNA zuständig sind.

Die DNA- Vervielfältigung beruht auf drei Schritten, einem Denaturierungs-, einem Hybridisierungs- und einem Syntheseschritt:

- Denaturierung: Das Lösungsgemisch aus DNA-Molekülen, Polymerase, Primer und Nukleotiden wird auf 95° C erhitzt, was zur Trennung der DNA-Stränge führt.
- Hybridisierung: Durch Herabsetzung der Temperatur auf 55°C binden sich synthetische Oligonukleotid- Primer an DNA- Abschnitte, was dazu führt, dass weitere komplementäre Nukleotide

angebaut werden und die Verbindung zwischen DNA und Primer verstärken.

● Synthetisierung: Wird die Temperatur wieder auf 72°C erhöht (ideale Arbeitstemperatur für die Polymerasen), um weitere Nukleotide an die DNA-Stränge anzulagern und die Extension des cDNA-Stranges zu ermöglichen.

Jede Wiederholung des genannten Zyklus führt zur Verdoppelung der DNA- Moleküle, woraus theoretisch nach circa 20 Zyklen ungefähr 1 Million Moleküle entstehen. In der Praxis wird eine geringere Effizienz erreicht, da die PCR- Reaktion initial linear, später exponentiell und gegen Ende plateauartig verläuft, da u. a. die Enzymaktivität im Verlauf des Prozesses nachlässt. Diese Unsicherheit führte zur Entwicklung der quantitativen real time PCR. Dabei wurde neben dem gesuchten Template eine weitere DNA-Vorlage in bekannter Menge als interner Standard

hinzugefügt. Bei der rt-PCR wird ein fluoreszierender Farbstoff (in dieser Versuchsreihe: FAM) in die DNA eingebaut und durch UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt. So kann die Fluoreszenz und die Konzentration der Ziel-DNA mittels TaqMan-Sonde gemessen werden. TaqMan-Sonden sind mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff und einem Quencher versehen. Unter Quencher versteht man Moleküle, welche die Fluoreszenz von Farbstoffen in ihrer Nähe abfangen. Die Polymerasen bei der PCR sind in der Lage, die TaqMan-Sonden bei Verdoppelung der DNA abzubauen (durch die 5'-, 3'-Exonukleaseaktivität), wobei zunächst Reporterfarbstoff freigesetzt wird, der sich somit dem Einfluss des Quenchers entzieht. Die Fluoreszenz des Farbstoffes wird somit nur dann messbar, wenn die Polymerase den gewünschten DNA-Strang kopiert hat. Jedes freigesetzte Molekül an Reporterfarbstoff ist gleichzusetzen mit

einem neugebildeten DNA- Strang, d.h. mit der TaqMan- Sonde kann somit die gebildete Menge von DNA gemessen werden.

Die Real- time PCR wurde in 96- well Platten durchgeführt. Dafür wurde ein Reaktionsvolumen von 25 ul (2 ul cDNA + 23 ul Mastermix) pro well verwendet. Für jede zu testende Zellprobe wurde je Sonde (TRB3, BAX, CHOP) ein zweifacher Ansatz durchgeführt. Der Mastermix setzt sich aus folgenden Bestandteilen zusammen: TaqMan-Primer Mix (12,5 ul/ well), 1,25 ul/ well Sonden Primer Mix (TRB3, BAX, CHOP) und 9,25 ul/ well RNase- freies H₂O. Beta- Aktin (Strukturprotein), in allen eukaryotischen Zellen nachweisbar (alle Gendaten wurden aus der Onlineplattform genecards.org bezogen), (Holmes et al., 1990), wurde als „Housekeeping- Gene“ verwendet. Die Expression der Gene TRB3, BAX, CHOP wurde mittels Primer- Sonden- Mix der Firma Applied Biosystems (TaqMan Gene

Expression Assays) gemessen. Dieser beinhaltet spezifische Oligonukleotide mit einem 5'- FAM-Reporterfarbstoff, einem Minor-Groove-Binder, welcher die Schmelztemperatur erniedrigt durch Anlagerung an die kleine Furche der DNA und einem 3'- Quencher, der die Fluoreszenz des benachbarten Reporterfarbstoffs supprimiert. Die Aktivierung der Polymerase im Thermo-Cycler (C 1000) erfolgte bei 95° über 5 min. Danach schloss sich eine Denaturierung über 30 Sekunden bei gleicher Temperatur an. Die Anlagerung der Primer unter 60° dauerte 30 Sekunden, die Elongation bei 70° weitere 30 Sekunden. Die diese Schritte beinhaltenden Zyklen wurden 44- mal durchlaufen. Durch Absenkung der Temperatur auf 50° über 5 Sekunden wurde schließlich eine Inaktivierung erreicht.

Die Quantifizierung der PCR beruht auf der Berechnung des Fluoreszenzschwellenwertes (Ct-Wert), ein Wert bei dem die Reporterfluoreszenz

die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Anfänglich wird nur die Basis- oder Hintergrundfluoreszenz bestimmt, da die Reporterfluoreszenz aufgrund der geringen Templatekonzentration während der ersten PCR- Zyklen normalerweise nicht meßbar ist. Die DNA- Quantifizierung beruht auf der Kinetik der PCR- Reaktion und nicht auf der absoluten Menge des PCR- Produkts. Als Richtwert wird der Ct- Wert eingesetzt, da zum Meßzeitpunkt die Amplifikation exponentiell ist und bezüglich PCR- Reaktion keine limitierenden Faktoren (z. B. Nukleotidmangel, nachlassende Enzymaktivität usw.) vorliegen. Basierend auf der $\Delta\Delta\text{Ct}$ - Methode (Bio-Rad Laboratories, 2006; Ramon Goni, 2009; Schmittgen and Livak, 2008) wurde der ΔCt - Wert, sowohl für die Behandlung als auch für die Kontrolle, ermittelt, indem jeweils der Ct- Wert des Housekeeping- Gens (β - Aktin) vom Ct- Wert des zu untersuchenden Gens abgezogen wurde. Anschließend wurde der ΔCt -

Wert der Kontrolle vom ΔCt - Wert der Behandlung subtrahiert, um $\Delta\Delta\text{Ct}$ zu erhalten. Zuletzt konnte unter Verwendung der Formel (Relativer Genexpressionsunterschied Behandlung| Kontrolle) $= 2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$ der Genexpressionsunterschied berechnet werden.

3.3.9 Proteinchemische Methoden

3.3.9.1 Proteinbestimmung mittels BCA- Assay

Zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die BCA Methode nach Pierce angewandt. Der BCA Assay beruht auf der Biuret- Reaktion, welche in alkalischer Lösung die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} bewirkt und auf einer konzentrationsabhängigen Erfassung von monovalenten Cu^{1+} basiert. Bicinchoninsäure, ein chromogener Wirkstoff, geht mit reduziertem

Kupfer einen Komplex (Chelatbildung) ein und führt im Photometer zu einer starken Absorption des Lichts bei 562 nm. Das BCA Protein Assay Kit eignet sich zur Bestimmung von Proteinkonzentration zwischen 20- 2000 ug/ml.

Um den Proteingehalt der Zellproben bestimmen zu können, wurde zuerst eine Eichkurve anhand einer Verdünnungreihe (Gemisch aus BSA und RIPA in einem Konzentrationsbereich von 0 ug/ml - 1000 ug/ml) erstellt. Dazu wurde jeweils Kupfersulfat und BCA hinzugegeben, um eine photometrische Bestimmung zu ermöglichen. Die zu untersuchenden Zellproben (in RIPA) wurden für eine Proteinbestimmung wie folgt vorbereitet: Mischung unter Verwendung von 5 ul RIPA-Zellsuspension, 45 ul RIPA, 20 ul 4%- Kupfersulfat, 1 ml BCA- Lösung mit nachfolgender Inkubation über 30 Minuten bei 37°C. Die Proteinmenge wurde im Photometer bei 562 nm bestimmt.

3.3.10 Western Blot

Der Western Blot ist eine der Methoden zur Bestimmung einzelner Proteine in einer Probe und basiert auf einer hochauflösenden Elektrophorese und einem immunologischen Nachweis der Proteine. In einem elektrischen Feld ist die Wanderungsgeschwindigkeit von Molekülen proportional der Gesamtladung und indirekt proportional zur Masse, wobei die Nettoladung eines Proteins auch pH- abhängig ist.

3.3.10.1 SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese

3.3.10.1.1 Vorbereitung der Gele

Vier Glasplatten unterschiedlicher Größe wurden mit Ethanol gereinigt und paarig in jeweils in einen

Stellrahmen („Casting frame“) gespannt und danach in einen Stellkasten („Casting stand“) gestellt.

Das Trenngel („resolving gel“) wird vorbereitet und setzt sich für zwei Gele wie folgt zusammen:
6,25ml destilliertes Wasser

5 ml 30% Acrylamid

3,75ml 4x Lower Puffer

150ul APS

15ul Temed

Das Gemisch wird zwischen je zwei Glasplatten geschüttet und der Zwischenraum bis zu einer Markierung gefüllt. Luftblasen werden mit Aufgießen von Isopropanol entfernt und diese Flüssigkeit mit Filterpapier nach 20- 30 min wieder aufgesaugt.

Auf das Trenngel wird eine Schicht eines sogenannten Sammelgels bis zum oberen Rand der Glasplatte aufgegossen. Das Sammelgel entspricht einer Mischung aus:

5,7 ml destilliertem Wasser

1,3 ml 30% Acrylamid

2,25 ml 4x Upper Puffer

100 ul APS

10 ul Temed

Danach wird ein Kamm von oben in das Sammelgel eingesetzt und dort in der Lösung belassen bis das Gel nach 20- 30 min auspolymerisiert bzw. verfestigt ist. Nach Entfernung des Kammes dienen die Vertiefungen als Taschen zur Ladung der Proben.

3.3.10.1.2 Vorbereitung der Proben

Die in RIPA- Puffer gelösten Zellproben wurden mit 1: 5 Laemmli- Puffer versetzt. Zuvor wurde der Laemmli- Puffer bei 99°C für 5 min erhitzt und nach Zugabe das Gemisch erneut 5 min bei 99°C inkubiert und abschließend 10 Sekunden zentrifugiert. Der Laemmli- Puffer bewirkt die Reduktion von Disulfidbrücken durch 2- β - Mercaptoethanol, was zur Bildung von langgestreckten Polypeptidketten führt. Der 5- fach Laemmli- Puffer setzt sich zusammen aus:

10 ml Glycerin

12,5 ml Upper Tris

30 ml 10% SDS

5 ml β - Mercaptoethanol

1 Spatelspitze Bromphenolblau

ad 100 ml destilliertes Wasser

Die hydrophile Seite von SDS lagert sich an die Proteine, der hydrophobe, negativ geladene Teil zeigt vom Protein weg.

3.3.10.1.3 Elektrophorese

Zur Durchführung der Auftrennung der Proteine nach Größe und Ladung wird der Stellkasten mit 10x Elektrophorese Running Puffer gefüllt. Der Running Puffer beinhaltet:

15,1g Tris

94g Glycin

50 ml 10%ige SDS- Lsg.

ad 1000 ml destilliertes Wasser

Die Eiweißproben werden in die Applikationstaschen gegeben. Als Standard für den

Proteinvergleich wurde 10 µl Bench Mark Prestained Protein Ladder (Invitrogen) benutzt. Pro Geltasche wurden jeweils 30 µg der denaturierten Proteinproben geladen. Die Auftrennung im Sammelgel erfolgte bei 80 V, die im Trenngel bei 180 V. Der in die erste Geltasche applizierte oben genannte Marker hat zehn Referenzbanden, die als Kontrolle bei der Proteinbestimmung (kDa) herangezogen werden.

3.3.10.2 Proteinübertragung (Semi-Dry Blot)

Die elektrisch geladenen Proteine werden aus den Gelbanden mit Hilfe des Semidry Blot Systems unter Anlegung einer Spannung im elektrischen Feld auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Nitrozellulosemembran und 20 Whatman-paper wurden zuvor in Semidry Blotting Puffer getränkt.

Semidry Blotting Puffer:

2,93 g Glycin

5,82 g Tris

3,7 ml 10%ige SDS- Lsg.

200 ml Methanol

ad 1000 ml destilliertes

Wasser

Das Gel wurde zusammen mit der Nitrozellulosemembran und den beidseits aufgelegten Whatman- Paper in einer Art Sandwich (10 Whatman- Paper → Nitrozellulosemembran → Gel → 10 Whatman- Paper) geordnet; dabei sollten zwischen Gel und Membran keine Luftblasen zurückbleiben. Das „Sandwich“ wurde in ein Blot-Gerät gegeben und einem elektrischen Feld ausgesetzt, wobei für die Membranfläche von $9 \times 6 \text{ cm} = 54 \text{ cm}^2$ ein Gleichstrom von 54 mA für 2h

gewählt wurde. Die negativgeladenen Proteinmoleküle bewegen sich in Richtung Anode. Durch die Nitrozellulosemembran wird diese Ausrichtung gestoppt und führt zum Transfer der Proteinbanden auf die Membran in derselben Anordnung wie auf dem Gel. Die mit Proteinbeladene Nitrozellulosemembran wurde mit Ponceau S Lösung rot gefärbt, anschließend mit Wasser und PBS + Tween gewaschen.

3.3.10.3 Membranblockade und Beladung mit Antikörpern

Vor Gabe von spezifischen Antikörpern wurde die Nitrozellulosemembran mit Blockadepuffer (5% Magermilch) für 1h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. In der Folge wurde die Membran 4 mal über jeweils fünf Minuten mit PBS + Tween (5 Tbl. Phosphahte Buffered Saline + 1 ml Tween + ad destilliertes Wasser) gewaschen.

Die gewaschene Membran wird mit dem ersten Antikörper (TRIB3 (N-terminal) rabbit 1: 1000, Sigma- Aldrich in 5% Magermilch) gelöst und über Nacht bei 4°C (auf Schüttler) inkubiert. Danach erfolgte eine Waschung mit PBS + Tween (4x 5 min). Anschließend wurde der sekundäre Antikörper hinzugegeben (ECL Peroxidase labelled anti- rabbit 100 ul, 1: 1000, Amersham, GE Healthcare UK) und über eine Stunde auf einem Schüttler bei Raumtemperatur belassen. Erneut folgten mehrere Waschungen mit PBS + Tween. Rapid Step ECL Reagenz wird auf die Nitrozellulosemembran gesprüht und für 2 min inkubiert und später die Membran in einer Dunkelkammer auf einem Röntgenfilm entwickelt. Der Bench Mark Prestained Protein Ladder (Standard) ermöglicht die Messung der Proteinbanden in kDa. Auf diese Weise ermöglicht der Western Blot die Bestimmung von Proteinart und -menge.

3.3.11 Versuchsreihe Cholesterin-Uptake

Zur Untersuchung des Cholesterol- uptakes wurde auf ähnliche Versuchsansätze wie bei der Versuchsreihe für die PCR (siehe 3.3.5) zurückgegriffen, wobei eine Gesamtzeit von 54h bei allen Untersuchungsanordnungen eingehalten wurde, um den Zeitfaktor, der sich eventuell auf die Proliferation der Zellen auswirken könnte, zu vermeiden. Entsprechend der Anpassung betragen die Knockdowninkubationszeiten 42 bzw. 48h. Bei den einzelnen Untersuchungen jeder Zellreihe wurden 6- well Platten verwendet und dabei drei wells als Versuchsreihe und drei als Kontrolle benutzt und viermal wiederholt (triplet-Anordnung; n= 4). Im Gegensatz zu den THP-1-Zellen wurden die differenzierten Makrophagen bei der Cholesterinversuchreihe in einer T 175er Flasche angezüchtet. Danach wurde das Medium aus der Flasche abpipettiert, zur Ablösung der am

Boden adhärenenten Makrophagen 7ml Accutase (da für die Zellen schonender als Trypsin) dazugegeben und für 2- 5 min im Brutschrank (37°C) inkubiert. Zur Neutralisation der eventuell toxischen Wirkung von Accutase für die Zellen wurde diese durch Hinzugabe von RPMI Medium neutralisiert. Die verbliebene korpuskuläre Suspension wurde in ein 50 ml Röhrchen gegeben, um eine Zellauszählung durchführen zu können (siehe 3.3.3). Dabei wurde für eine Versetzung mit Trypanblau in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß gleich der entsprechende Zellsuspensionsanteil (orientierend an der Verdünnung, d.h. entweder 1:10 oder 1:5 Verdünnung) aus dem 50 ml tube entnommen. Nach der Auszählung wurden wie in 3.3.5 wieder 1 Mio. Zellen/ 2 ml (pro well) ausgesät, um die jeweilige Versuchsreihe zu starten. Nach Ablauf der vorgegebenen Untersuchungszeiten wurde der Inhalt eines wells in ein 2 ml Eppendorf- tube umpipettiert. Während die THP- 1- Zellen direkt

abpipettiert werden konnten, war bei differenzierten Makrophagen erneut eine Ablösung vom Boden der wells mittels Accutase notwendig. In der Folge wurden die Eppendorfgefäße zentrifugiert (8000 rpm, 7 min, 21°C) und der Überstand nach Entnahme aus der Zentrifuge abpipettiert und das Zellpellet belassen.

3.3.12 Fluoreszenzspektrometrie: BODIPY® Cholesterin

Unter Dunkelraumbedingungen wurde in einem neuen Eppendorfgefäß eine BODIPY®/ PBS stock solution zubereitet (Verdünnung: 1: 100). Den Zellpellets der Versuchsreihe wurde jeweils 100 ul BODIPY®/ PBS Lösung zugegeben (Kontrolle: 100 ul PBS) und die tubes auf einem Schüttler bei 37°C für 1h inkubiert. Nach erneuter Zentrifugierung und Entfernung des Überstandes wurde in jedes der tubes 100 ul PBS- Puffer zum

Waschen hinzugefügt, 5-7 min gerüttelt und anschließend zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde eine Lösung aus Igepal und PBS angefertigt (Verdünnung: 1: 1000). Davon wurden 100 ul den Zellpellets addiert, um die Plasmamembran der Zellen zu lysieren. Der Inhalt eines tubes wurde daraufhin in ein well einer schwarzen 96- well Platte umpipettiert und der Cholesteringehalt in einem Fluoreszenzspektrometer ausgewertet. Der Cholestrinuptake berechnete sich aus dem Mittelwert der Versuchsreihe abzüglich des Mittelwertes der Kontrolle.

3.3.13 Statistische Analysen

Aus den Ergebnissen wurden Mittelwert und SD berechnet. Die statistische Auswertung der jeweils zwei zu vergleichenden Gruppen erfolgte mittels Graph Pad Prism 6 über einen ungepaarten Welch

t- Test. Bei allen Berechnungen wurde das Signifikanzniveau auf p- Werte $\leq 0,05$ festgelegt.

Der t- Test vergleicht die Mittelwerte von zwei Stichproben unter Berücksichtigung der Varianz. Da nicht auszuschließen ist, dass die Mittelwerte aus Verteilungen mit unterschiedlichen Streuungen stammen, wurde der Welch t- Test verwendet. Dieser ist bei unterschiedlichen Varianzen dem Student t- Test überlegen und bei gleicher Varianz diesem vergleichbar.

4. Ergebnisse

4.1 Differenzierung von THP-1- Zellen zu differenzierten Makrophagen mittels 12- phorbol- myristate- acetate (PMA)

Optimal für die Differenzierung stellte sich eine Konzentration von 400ng heraus. Die wirksamste Inkubationszeit lag hierbei bei 48h (vs 24h, 72h).

4.2 TRB3- mRNA- Expression in humanen THP-1- Zellen und in differenzierten Makrophagen

Da THP-1- Zellen hämatopoetisch eine Vorstufe der differenzierten Makrophagen darstellen und sich im Phänotyp und in ihrer Funktion

unterscheiden, wurde die TRB3- Genexpression in beiden Zellarten untersucht. Quantitative PCR (rt-PCR) Messungen zeigten, dass in beiden Zelltypen TRB3- Gen in geringer Menge exprimiert wird. Die TRB3- mRNA- Expression in differenzierten Makrophagen war 3-fach höher als in THP-1- Zellen [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) Makrophagen Kontrolle relativ zur THP-1- Kontrolle: 2,815 (\pm SD 0,048), $p < 0,01$] (Abb. 18). Im Western Blot war das TRIB3 Protein in differenzierten Makrophagen kaum darstellbar während es sich in THP-1- Zellen erkennbar aber in geringer Konzentration zeigte (Abb. 19, Western Blot).

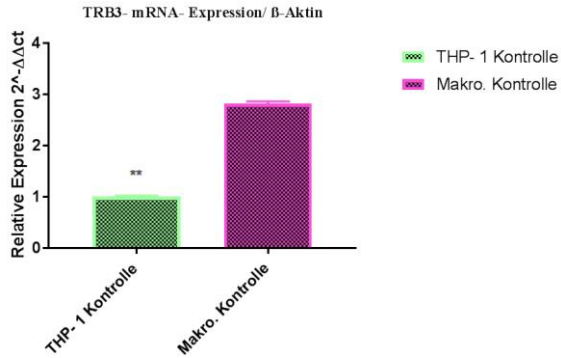


Abb. 18: TRB3- mRNA- Expression in THP- 1- Zellen und differenzierten Makrophagen

TRB3- mRNA ist 3-fach höher in differenzierten Makrophagen als in THP-1- Zellen ($p < 0,01$).

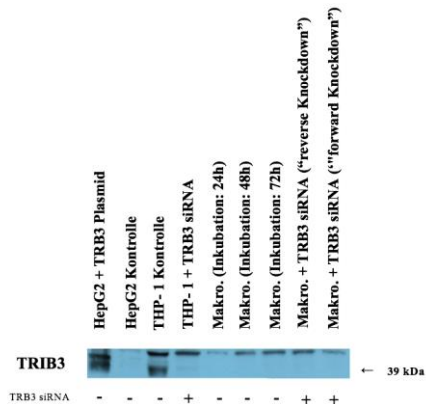


Abb. 19: TRIB3- Protein in THP-1- Zellen und differenzierten Makrophagen (Western Blot).

TRIB3- Protein ist in differenzierten Makrophagen kaum darstellbar während es sich in THP-1- Zellen erkennbar, aber in geringer Konzentration, zeigte. HepG2 \pm TRB3- Plasmid wurden neben dem Benchmark Prestained Protein Ladder Marker als Vergleichskontrolle verwendet. Für „forward“ und „reverse“ Knockdown siehe 3.3.4.

4.3 TRB3- mRNA Knockdown in THP-1- Zellen und differenzierten Makrophagen

Um den Einfluss von TRB3 auf Stoffwechselfvorgänge, wie den Cholesterin-Uptake, genauer beurteilen zu können, wurde die TRB3- Expression durch Knockdown verändert um diesen Effekt in Bezug auf den Cholesterin- Uptake zu prüfen. Im Western Blot war ein TRB3- Knockdown nur in THP-1- Zellen darstellbar (Abb. 20), weshalb sich die weiteren Untersuchungen auf die rt- PCR beziehen.

Ein Lipofectamine induzierter Knockdown führte zu einer TRB3- mRNA- Reduktion von 43 % in THP-1- Zellen [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) THP-1 + TRB3 siRNA relativ zur THP-1- Kontrolle: 0,576 (\pm SD 0,009), $p \leq 0,05$]. Verglichen wurden Zellen der THP-1- Kontrolle (unbehandelte Zellen) mit

TRB3- transfizierten Zellen (THP-1 + TRB3 siRNA) (Abb. 20). In Anlehnung dazu betrug der Rückgang bei differenzierten Makrophagen 72% [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) relativ zur Makrophagen-Kontrollgruppe: 0,280 (\pm SD 0,027), $p \leq 0,001$] (Abb. 21). Der jeweils mittlere Balken der Abbildungen entspricht einer Kontroll- siRNA ohne TRB3- Beeinflussung und wurde in der statistischen Bewertung nicht berücksichtigt. Sie dient lediglich dem Ausschluss einer Änderung des TRB3- Gehalts bei RNA- Interferenz ohne TRB3- Knockdown. Allen dargestellten Versuchen liegt, nachdem eine Änderung der TRB3- mRNA- Expression durch eine TRB3- Kontroll- siRNA in beiden Zellarten ausgeschlossen werden konnte, der Vergleich bezogen auf normale, unbehandelte Zellen zugrunde. Bei THP-1- Zellen betrug der „fold change“ von THP-1 + TRB3- Kontroll- siRNA relativ zur THP-1- Kontrolle: 1,141, $p = ns$ (Abb. 20). Bei Makrophagen kam es zu einem

„fold change“ der TRB3- Kontroll- siRNA relativ zur Makrophagen Kontrolle von: 1,044, $p = ns$ (Abb. 21).

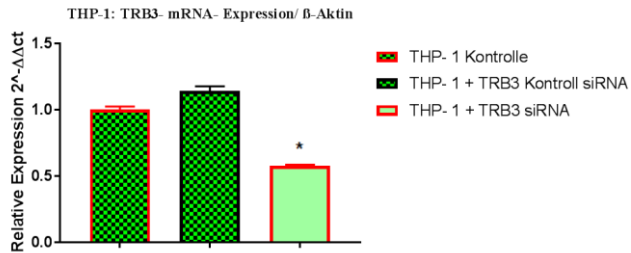


Abb. 20: TRB3- mRNA- Expression und Knockdown in THP- 1- Zellen

Der Knockdown von TRB3 mit Lipofectamine führt in THP-1- Zellen zu einer Reduktion von TRB3- mRNA um 43% ($p < 0,05$).

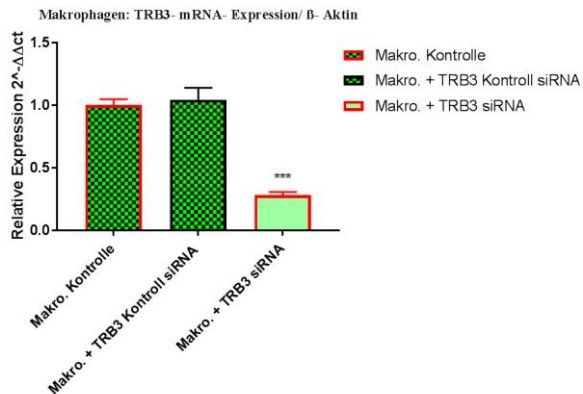


Abb. 21: TRB3- mRNA- Expression und Knockdown in differenzierten Makrophagen

Der Knockdown mit Lipofectamine bewirkt in differenzierten Makrophagen eine Reduktion von TRB3- mRNA um 72% ($P < 0,001$).

Der Knockdown von TRB3 in THP-1 Zellen und differenzierten Makrophagen führte zu TRB3-mRNA-Expressionswerten, die gering waren und sich am Rande der Messbarkeit bewegten. Zur Überwindung dieses Problems wurden die Zellen mit Thapsigargin stimuliert, um höhere TRB3-Werte zu erzielen. Hierzu wurden unterschiedliche Thapsigarginindosierungen verwendet und deren Effekt auf TRB3- mRNA untersucht.

4.4 Effekte von Thapsigargin auf TRB3- mRNA- Expression in THP- 1- Zellen und differenzierten Makrophagen

Unter der Thapsigargininkubation resultierte ein dosisabhängiger Anstieg der TRB3- mRNA-Expression. Im Vergleich zur THP-1- Kontrolle

betrug die Steigerung bei 0,5 uM Thapsigargin das 8-fache [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) THP-1 + 0,5uM Thap. relativ zur THP-1- Kontrolle: 7,754 (\pm SD 0,102), $p \leq 0,0001$], bei 1 uM TG das 8- fache [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) THP-1 + 1uM Thap. relativ zur THP-1- Kontrolle: 7,983 (\pm SD 0,066), $p \leq 0,0001$], bei 1,5 uM TG das 12- fache [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) THP-1 + 1,5uM Thap. relativ zur THP-1- Kontrolle: 11,677 (\pm SD 0,142), $p \leq 0,0001$], bei 2 uM TG das 12- fache [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) THP-1 + 2uM Thap. relativ zur THP- 1- Kontrolle: 12,105 (\pm SD 0,188), $p \leq 0,0001$] und bei 5 uM TG das 31- fache [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) THP-1 + 5uM Thap. relativ zur THP- 1- Kontrolle: 30,700 (\pm SD 0,193), $p \leq 0,0001$] (Abb. 22).

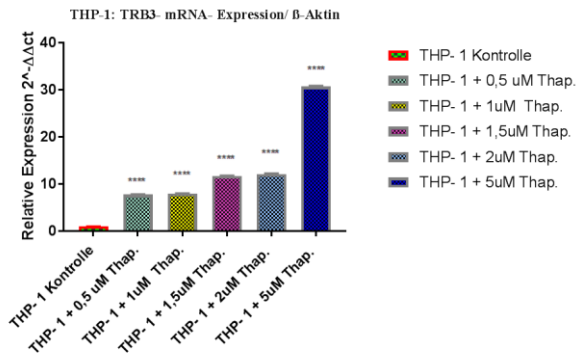


Abb. 22: TRB3- mRNA- Expression in THP-1- Zellen unter Thapsigargin

Durch Thapsigargin kommt es zum dosisabhängigen Anstieg von TRB3- mRNA in THP1- Zellen.

Ein ähnliches Verhalten zeigte sich bei differenzierten Makrophagen. Hier lagen die Anstiege im Vergleich zum Kontrollwert allesamt höher, bei 0,5 uM TG 7- fach [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) Makrophagen + 0,5uM Thap. relativ zur Makrophagen Kontrolle: 7,201 (\pm SD 0,605), $p \leq 0,01$], bei 1 uM TG 14- fach [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) Makrophagen + 1uM Thap. relativ zur Makrophagen Kontrolle: 13,983 (\pm SD 0,358), $p < 0,0001$], bei 1,5 uM TG 18- fach [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) Makrophagen + 1,5 Thap. relativ zur

Makrophagen Kontrolle: 17,577 (\pm SD 0,964), $p \leq 0,001$], bei 2 uM TG 22- fach [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) Makrophagen + 2uM Thap. relativ zur Makrophagen Kontrolle: 21,904 (\pm SD 1,144), $p \leq 0,001$] und bei 5 uM TG 32- fach [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) Makrophagen + 5uM Thap. relativ zur Makrophagen Kontrolle: 31,464 (\pm SD 2,434), $p \leq 0,01$] (Abb. 23).

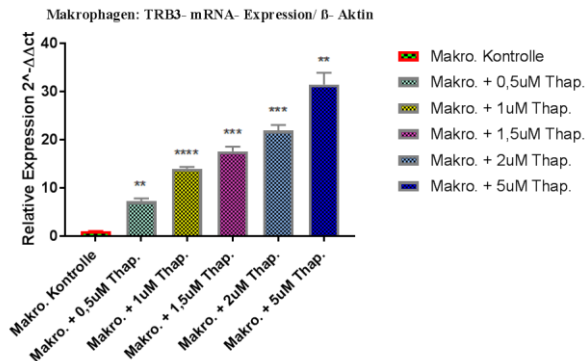


Abb 23: TRB3- mRNA- Expression in differenzierten Makrophagen unter Thapsigargin

Durch Thapsigargin kommt es zu einem dosisabhängigen Anstieg von TRB3- mRNA in differenzierten Makrophagen.

Bei der Prüfung der Thapsigarginwirkung wurde bei 1,5 uM TG ein moderater und bei 5 uM TG ein

etwas deutlicherer Anstieg der TRB3-Genexpression dokumentiert und beide Konzentrationen wurden als geeignet erachtet um den Knockdown- Effekt von TRB3 eindeutiger darstellen zu können.

4.5 Effekte von Thapsigargin auf TRB3-mRNA- Expression in THP-1- Zellen (siRNA -/-) und differenzierten Makrophagen (siRNA -/-)“

Die Wirkung einer Thapsigarginstimulation mit 1,5 uM TG nach Knockdown in THP-1- Zellen ergab eine Reduktion der TRB3- Genexpression von 26% bezogen auf eine TG-Stimulation mit 1,5 uM TG ohne Knockdown [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) THP-1 + 1,5uM Thap. relativ zur THP- 1- Kontrolle: (11,677 (\pm SD 0,142))] vs. [„fold change“ (2^{-

$\Delta\Delta\text{Ct}$) THP-1 + siRNA + 1,5 μM Thap. relativ zur THP-1-Kontrolle: 8,690 (\pm SD 0,119)] [$p \leq 0,05$]. Bei Stimulation mit 5 μM TG nach Knockdown betrug die TRB3-Reduktion 28% bezogen auf eine Stimulation mit 5 μM TG ohne Knockdown [„fold change“ ($2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$) THP-1 + 5 μM Thap. relativ zur THP-1-Kontrolle: 30,696 (\pm SD 0,193)] vs. [„fold change“ ($2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$) THP-1 + TRB3 siRNA + 5 μM Thap. relativ zur THP-1-Kontrolle: 22,085 (\pm SD 0,331)] [$p \leq 0,01$] (Abb. 24).

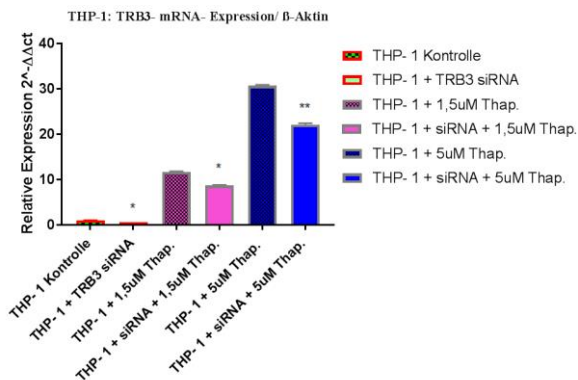


Abb. 24: TRB3- mRNA- Expression in THP-1- Zellen unter Knockdown und Thapsigargin

Die Behandlung von THP-1- Zellen (siRNA^{+/+} und siRNA^{-/-}) mit jeweils 1,5 μM und 5 μM Thapsigargin führte zu einem Anstieg der TRB3- Expression unter beiden Dosierungen. Das Ausmaß des jeweils signifikanten Effektes nach TRB3- Knockdown war bei unbehandelten und TG behandelten THP-1- Zellen vergleichbar (siehe Abb. 20).

In differenzierten Makrophagen betrug die Reduktion nach TRB3- Knockdown und anschließender TG- Stimulation mit 1,5uM TG im Vergleich zur TG- Stimulation mit 1,5uM TG ohne Knockdown 82% [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) Makrophagen + 1,5uM Thap. relativ zur Makrophagen Kontrolle: 17,577 (\pm SD 0,964)] vs. [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) Makrophagen + TRB3-siRNA + 1,5uM Thap. relativ zur Makrophagen Kontrolle: 3,208 (\pm SD 0,122)] [$p \leq 0,001$]. In ähnlicher Weise ergab sich für eine Stimulation mit 5uM TG nach TRB3- Knockdown im Vergleich zu einer solitären TG- Stimulation mit 5uM TG ohne Knockdown eine Reduktion von 85% [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) Makrophagen + 5uM Thap. relativ zur Makrophagen Kontrolle: 31,464 (\pm SD 2,434)] vs. [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) Makrophagen + TRB3- siRNA + 5uM Thap. relativ zur Makrophagen Kontrolle: 4,722 (\pm SD 0,185)] [$p \leq 0,01$] (Abb. 25).

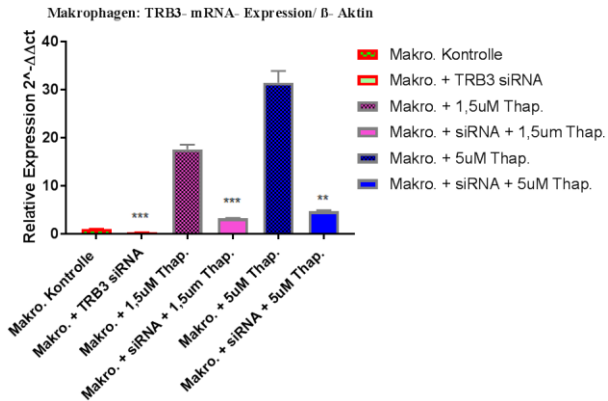


Abb. 25.: TRB3- mRNA- Expression in differenzierten Makrophagen unter TRB3- Knockdown und Thapsigargin

Die Behandlung von differenzierten Makrophagen (siRNA^{+/+} und siRNA^{-/-}) mit 1,5uM und 5uM Thapsigargin führte zu einem Anstieg der TRB3- Expression unter beiden Dosierungen. Das Ausmaß des jeweils signifikanten Effektes nach TRB3 Knockdown war bei unbehandelten und TG behandelten THP- 1- Zellen vergleichbar (siehe Abb. 21).

Um die Auswirkungen von Thapsigargin auf den ER- Stress zu untersuchen, wurde der ER- Stress Marker CHOP unter den verschiedenen TG- Dosierungen ermittelt.

4.6 Einfluss unterschiedlicher TG-Dosierungen auf CHOP- mRNA (ER-Stress- Marker) in THP- 1- Zellen und differenzierten Makrophagen

CHOP wird in THP-1- Zellen in geringer Menge exprimiert. Die Stimulation von TRB3 mittels TG führte zu einem 6- fachen Anstieg der CHOP- Expression unter 0,5 uM TG [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) THP-1 + 0,5uM Thap. relativ zur THP-1- Kontrolle: 5,839 (\pm SD 0,134), $p \leq 0,01$], zu einem 6- fachen Anstieg unter 1 uM TG [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) THP- 1 + 1uM Thap. relativ zur THP-1- Kontrolle: 5,684 (\pm SD 0,106), $p \leq 0,001$], zu einem 7- fachen Anstieg unter 1,5 uM TG [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) THP- 1 + 1,5uM Thap. relativ zur THP- 1- Kontrolle: 6,574 (\pm SD 0,145), $p \leq 0,001$], zu einem 10- fachen Anstieg

unter 2 uM TG [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) THP- 1 + 2uM Thap. relativ zur THP- 1- Kontrolle: 10,236 (\pm SD 0,269), $p \leq 0,01$] und zu einem 22- fachen Anstieg unter 5 uM TG [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) THP- 1 relativ zur THP-1- Kontrolle: 21,677 (\pm SD 0,834), $p \leq 0,01$] (Abb. 26).

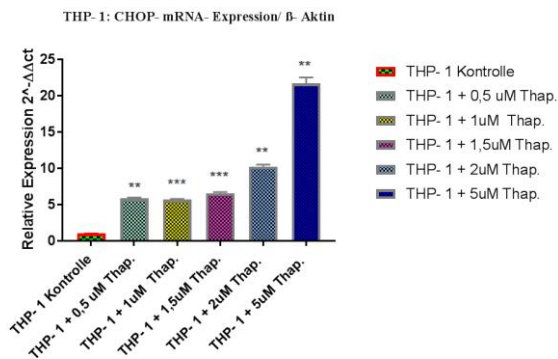


Abb. 26: CHOP- mRNA- Expression in THP- 1- Zellen unter Thapsigargin

Durch die Behandlung der THP1- Zellen mit 0,5uM, 1uM, 1,5uM, 2uM und 5uM Thapsigargin kommt es zum dosisabhängigen Anstieg von CHOP.

In differenzierten Makrophagen wird CHOP ebenfalls exprimiert. Die Stimulation von TRB3 mit verschiedenen TG- Konzentrationen führte zu einem Anstieg der CHOP- Expression (Abb. 27). Eine Stimulation mit 0,5 uM TG ergab einen

Anstieg um das 6- fache [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) Makrophagen + 0,5uM Thap. relativ zur Makrophagen Kontrolle: 5,706 (\pm SD 0,549), $p \leq 0,01$], 1uM TG um das 11- fache [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) Makrophagen + 1uM Thap. relativ zur Makrophagen Kontrolle: 11,457 (\pm SD 0,472), $p \leq 0,0001$], 1,5uM TG um das 14- fache [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) Makrophagen + 1,5uM Thap. relativ zur Makrophagen Kontrolle: 13,648 (\pm SD 0,743), $p \leq 0,001$], 2 uM TG um das 16- fache [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) Makrophagen + 2uM Thap. relativ zur Makrophagen Kontrolle: 15,800 (\pm SD 1,351), $p \leq 0,01$] und 5 uM um das 23- fache [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) Makrophagen + 5uM Thap. relativ zur Makrophagen Kontrolle: 22,884 (\pm SD 1,277), $p \leq 0,001$] (Abb. 27).

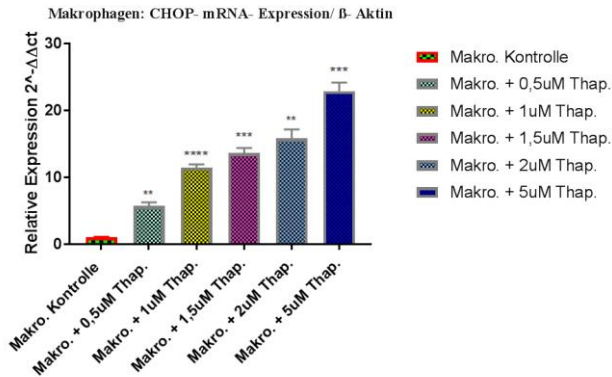


Abb. 27: CHOP- mRNA- Expression in differenzierten Makrophagen unter Thapsigargin

Durch die Behandlung der differenzierten Makrophagen mit 0,5uM, 1uM, 1,5uM, 2uM und 5uM Thapsigargin kommt es zu einem deutlichen dosisabhängigen Anstieg von CHOP.

4.7 Einfluss von TRB3- Knockdown auf CHOP- mRNA- Expression in THP-1- Zellen und differenzierten Makrophagen

Der Knockdown von TRB3 in THP-1- Zellen mittels Lipofectamine führte zu einem geringen (+ 5%), nicht signifikanten Anstieg von CHOP [„fold

change“ ($2^{\Delta\Delta Ct}$) THP-1 + TRB3 siRNA relativ zur THP- 1- Kontrolle: 1,045 (\pm SD 0,058), $p = ns$] (Abb. 28).

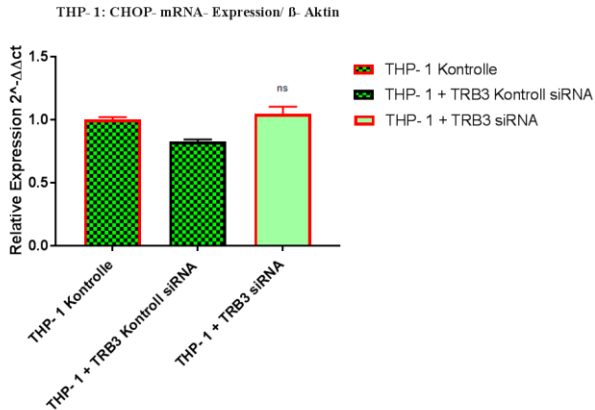


Abb. 28: CHOP- mRNA- Expression in THP- 1- Zellen unter TRB3- Knockdown

Der Knockdown von TRB3- mRNA durch Lipofectamine führt zu keiner signifikanten Änderung der CHOP- Expression in THP-1- Zellen.

In differenzierten Makrophagen ergab sich eine 10%- Steigerung von CHOP nach Knockdown [„fold change“ ($2^{\Delta\Delta Ct}$) Makrophagen + TRB3 siRNA relativ zur Makrophagen Kontrolle: 1,096 (\pm SD 0,078), $p = ns$] (Abb. 29).

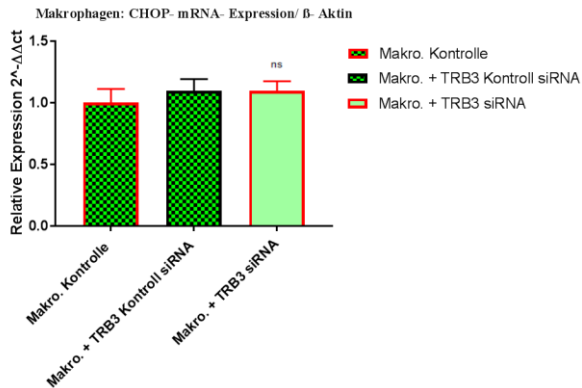


Abb. 29: CHOP- mRNA- Expression in differenzierten Makrophagen unter TRB3- Knockdown

Der Knockdown von TRB3- mRNA durch Lipofectamine führt zu keiner signifikanten Änderung der CHOP- Expression in differenzierten Makrophagen.

4.8 Einfluss von Thapsigargin auf CHOP- mRNA- Expression in THP- 1- Zellen (siRNA -/-) und differenzierten Makrophagen (siRNA -/-)

Die Gabe von 1,5 μ M TG nach TRB3- Knockdown führte in THP-1- Zellen zu einem minimalen, nicht-

signifikanten Anstieg von CHOP um 8% im Vergleich zur eine Stimulation mit 1,5uM TG ohne Knockdown [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) THP-1 + 1,5uM Thap. relativ zur THP-1- Kontrolle: 6,574 (\pm SD 0,145)] vs. [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) THP- 1 + TRB3 siRNA + 1,5uM Thap. relativ zur THP- 1- Kontrolle: 7,074 (\pm SD 0,109)] [p = ns] und bei einer Stimulation mit 5 uM TG nach TRB3-Knockdown im Vergleich zu einer TG- Stimulation mit 5uM TG ohne Knockdown auf ähnliche Weise zu einem nicht- signifikanten Anstieg von 12% [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) THP-1 + 5uM Thap. relativ zur THP- 1- Kontrolle: 21,677 (\pm SD 0,834)] vs. [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) THP- 1 + TRB3 siRNA + 5uM Thap. relativ zur Kontrolle: 24,294 (\pm SD 1,001)] [p = ns] (Abb. 30).

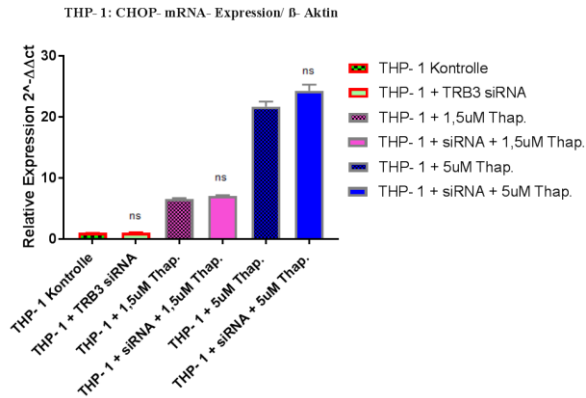


Abb. 30: CHOP- mRNA- Expression in THP- 1- Zellen unter TRB3- Knockdown und Thapsigargin

Die Behandlung von THP1- Zellen (siRNA^{+/+} und siRNA^{-/-}) mit 1,5uM und 5uM Thapsigargin führte zu einem Anstieg der CHOP- Expression unter beiden Dosierungen. Das Ausmaß des jeweils nicht signifikanten Effektes nach TRB3- Knockdown war bei normalen und TG behandelten THP- 1- Zellen vergleichbar.

In differenzierten Makrophagen zeigte sich ein tendenzieller, aber nicht signifikanter, Anstieg von CHOP von 17% nach TRB3- Knockdown mit anschließender TG- Behandlung mit 1,5uM TG im Vergleich zu einer TG- Behandlung mit 1,5uM TG ohne Knockdown [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) Makrophagen + 1,5uM Thap. relativ zur Makrophagen Kontrolle: 13,648 (\pm SD 0,743)] vs. [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) Makrophagen + TRB3

siRNA + 1,5uM Thap. relativ zur Makrophagen Kontrolle: 16,014 (\pm SD 1,322) [p = ns]. Eine ähnliche Tendenz zeigte sich für eine Stimulation mit 5uM TG nach TRB3- Knockdown im Vergleich zu einer TG- Stimulation mit 5uM TG ohne Knockdown, wobei hier ein nicht-signifikanter Anstieg von CHOP von 29% nachgewiesen werden konnte [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) Makrophagen + 5uM Thap. relativ zur Makrophagen Kontrolle: 22,884 (\pm SD 1,277)] vs. [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) Makrophagen + TRB3 siRNA + 5uM Thap. relativ zur Makrophagen Kontrolle: 29,421 (\pm SD 1,251)] [p = ns] (Abb. 31).

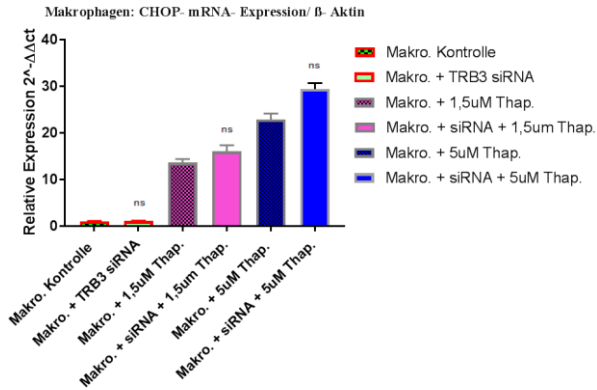


Abb. 31: CHOP- mRNA- Expression in differenzierten Makrophagen unter TRB3- Knockdown und Thapsigargin

Die Behandlung von differenzierten Makrophagen (siRNA^{+/+} und siRNA^{-/-}) mit 1,5uM und 5uM Thapsigargin führte zu einem Anstieg der CHOP- Expression unter beiden Dosierungen. Das Ausmaß des jeweils nicht signifikanten Effektes nach TRB3- Knockdown war bei normalen und TG behandelten Makrophagen vergleichbar.

Ergänzend zum ER- Stress Marker CHOP wurde auch der Apoptosemarker BAX in Bezug auf TRB3, TG und TRB3 Knockdown untersucht.

4.9 BAX- mRNA in THP-1- Zellen und differenzierten Makrophagen

Beide, sowohl THP-1- Zellen als auch differenzierte Makrophagen, weisen unter normalen Umständen eine BAX- mRNA-Expression auf.

In Abhängigkeit von den TG- Dosierungen kommt es zu einem überwiegend tendenziellen, nicht-signifikanten Anstieg der BAX- Expression in THP-1- Zellen und differenzierten Makrophagen und jeweils erst bei der höchsten TG- Dosierung mit 5uM TG zu einer signifikanten Änderung. In THP- 1- Zellen kam es unter Stimulation mit 0,5 uM TG zu einem Anstieg der BAX- Expression um 13% [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) THP-1 + 0,5uM Thap. relativ zur THP-1- Kontrolle: 1,133 (\pm SD 0,061), $p = ns$], bei 1 uM TG um 14% [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) THP-1 + 1uM Thap. relativ zur

THP-1- Kontrolle: 1,139 (\pm SD 0,020), $p = \text{ns}$], bei 1,5 μ M um 52% [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) THP-1 + 1,5 μ M Thap. relativ zur THP-1- Kontrolle: 1,524 (\pm SD 0,060), $p = \text{ns}$], bei 2 μ M TG um 131% (2,3- fach) [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) THP-1 + 2 μ M Thap. relativ zur THP-1- Kontrolle: 2,308 (\pm SD 0,172), $p = \text{ns}$], und bei 5 μ M TG um 328 % (4,3- fach) [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) THP-1 + 5 μ M Thap. relativ zur THP-1- Kontrolle: 4,278 (\pm SD 0,253), $p \leq 0,01$] (Abb. 32).

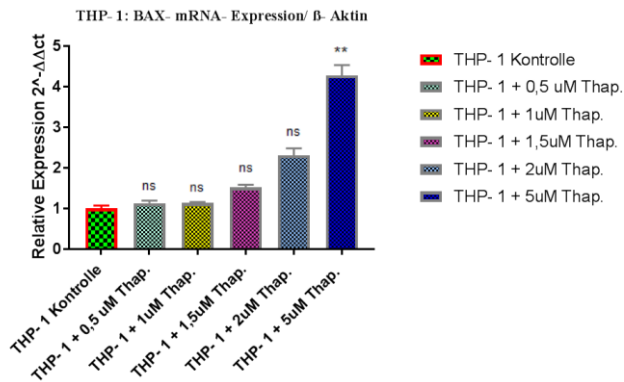


Abb. 32: BAX- mRNA- Expression in THP-1- Zellen unter Thapsigargin

THP-1- Zellen wurden mit 0,5 μ M, 1 μ M, 1,5 μ M, 2 μ M, 5 μ M Thapsigargin behandelt.

In differenzierten Makrophagen verlief der BAX-Anstieg unter TG ähnlich wie bei THP-1- Zellen. Eine Stimulation mit 0,5 uM TG ergab einen Anstieg von 4% [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) Makrophagen + 0,5uM Thap. relativ zur Makrophagen Kontrolle: 1,041 (\pm SD 0,263), $p = ns$], mit 1 uM TG von 21% [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) Makrophagen + 1uM Thap. relativ zur Makrophagen Kontrolle: 1,205 (\pm SD 0,067), $p = ns$], mit 1,5 uM TG von 42% [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) Makrophagen + 1,5uM Thap. relativ zur Makrophagen Kontrolle: 1,418 (\pm SD 0,221), $p = ns$], mit 2 uM TG von 76% [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) Makrophagen + 2uM Thap. relativ zur Makrophagen Kontrolle: 1,757 (\pm SD 0,325), $p = ns$], und mit 5uM TG von 180% (2,8- fach) [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) relativ zur Makrophagen Kontrolle: 2,802 (\pm SD 0,644), $p \leq 0,05$] (Abb. 33).

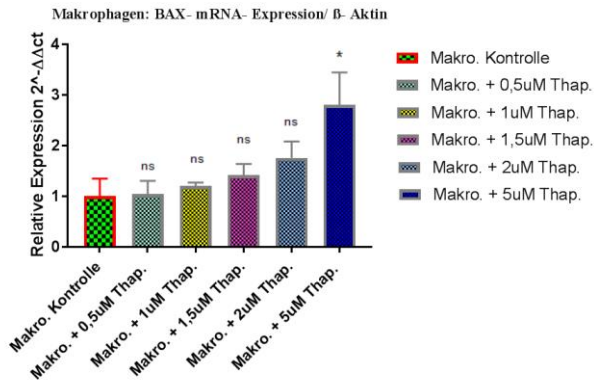


Abb. 33: BAX- mRNA- Expression in differenzierten Makrophagen unter Thapsigargin

Differenzierte Makrophagen wurden mit 0,5uM, 1uM, 1,5uM, 2uM, 5uM Thapsigargin behandelt. Nur unter 5 uM TG zeigte sich ein signifikanter 3-facher Anstieg von BAX- mRNA.

4.10 Einfluss von TRB3- Knockdown auf BAX- mRNA- Expression in THP-1- Zellen und differenzierten Makrophagen

Unter Lipofectamine (Knockdown) ließ sich sowohl in THP-1- Zellen als auch in differenzierten Makrophagen keine signifikante Reduktion der

BAX- Expression erkennen [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) THP-1 + TRB3 siRNA relativ zur THP-1-Kontrolle: THP-1: 0,892 (\pm SD 0,025), $p = ns$]; [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) Makrophagen + TRB3 siRNA relativ zur Makrophagen Kontrolle: 0,921 (\pm SD 0,079), $p = ns$] (Abb. 34; Abb. 35).

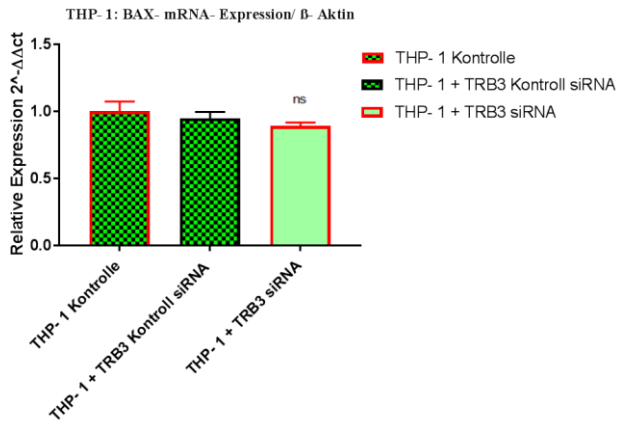


Abb. 34: BAX- mRNA- Expression in THP- 1- Zellen unter Knockdown

Unter TRB3- mRNA- Knockdown von THP-1- Zellen mit Lipofectamine blieb die Expression von BAX- mRNA annähernd unverändert.

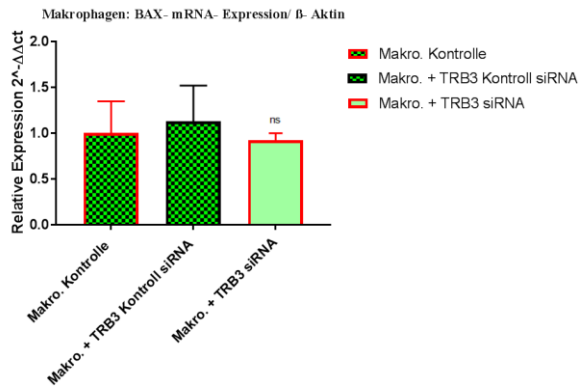


Abb. 35: BAX- mRNA- Expression in differenzierten Makrophagen unter TRB3- Knockdown

Unter TRB3- Knockdown von Makrophagen mit Lipofectamine blieb die Expression von BAX- mRNA annähernd unverändert.

4.11 Einfluss von Thapsigargin auf BAX- mRNA- Expression in THP- 1- Zellen (siRNA -/-) und differenzierten Makrophagen (siRNA -/-)

Die Stimulation mit 1,5 μ M und 5 μ M TG nach TRB3- Knockdown zeigte bei beiden Zellarten keine signifikante Reduktion der BAX- Expression

im Vergleich zur TG- stimulierten Zellen mit 1,5uM und 5uM TG ohne Knockdown. Bei THP-1-Zellen zeigte sich unter Stimulation mit 1,5 uM TG nach TRB3- Knockdown eine Reduktion von 6% im Vergleich zu einer mit 1,5uM TG- stimulierten Zelle ohne Knockdown [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) THP-1 + 1,5uM Thap. relativ zur THP-1-Kontrolle: 1,524 (\pm SD 0,060)] vs. [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) THP-1 + TRB3 siRNA + 1,5uM Thap. relativ zur THP-1- Kontrolle: 1,431 (\pm SD 0,036)] [p = ns] Bei einer Stimulation mit 5 uM TG nach TRB3- Knockdown kam im Vergleich zu einer mit 5uM TG- stimulierten Zellen ohne Knockdown zu einer Reduktion von 27% [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) THP-1 + 5uM Thap. relativ zur THP-1-Kontrolle: 4,278 (\pm SD 0,253)] vs. [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) THP-1 + TRB3 siRNA + 5uM Thap. relativ zur THP-1- Kontrolle: 3,125 (\pm SD 0,167)] [p = ns] (Abb. 36).

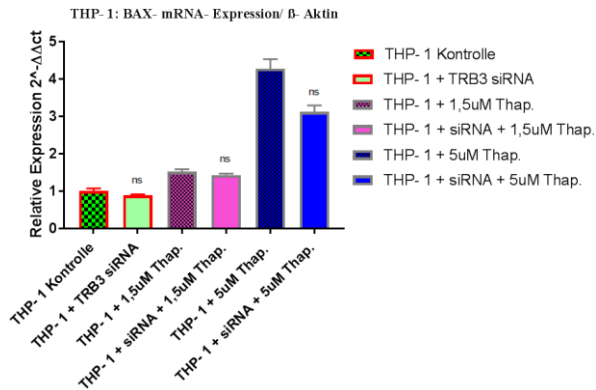


Abb. 36: BAX- mRNA- Expression in THP-1- Zellen unter Knockdown und Thapsigargin

Der TRB3 Knockdown mit Lipofectamine mit oder ohne nachfolgende Behandlung mit Thapsigargin zeigte bei THP-1- Zellen keine signifikante Änderung der BAX- mRNA- Expression.

Eine TG- Stimulation mit 1,5 μ M TG nach TRB3- Knockdown im Vergleich zur einer TG- Stimulation mit 1,5 μ M TG ohne Knockdown hatte in differenzierten Makrophagen hatte eine BAX- Abnahme von 20% zur Folge [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) Makrophagen + 1,5 μ M Thap. relativ zur Makrophagen Kontrolle: 1,418 (\pm SD 0,221)] vs. [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) Makrophagen + TRB3 siRNA + 1,5 μ M Thap. relativ zur THP-1- Kontrolle: 1,132 (\pm SD 0,105)] [$p = ns$]. Bei einer Stimulation mit 5 μ M TG nach TRB3- Knockdown

kam es im Vergleich zu einer TG- Stimulation mit 5uM TG ohne Knockdown zur einer Abnahme der BAX- Expression von 32% [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) Makrophagen + 5uM Thap. relativ zur Makrophagen Kontrolle: 2,802 (\pm SD 0,644)] vs. [„fold change“ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) Makrophagen + TRB3 siRNA + 5uM Thap. relativ zur Makrophagen Kontrolle: 1,897 (\pm SD 0,327)] [p = ns] (Abb. 37).

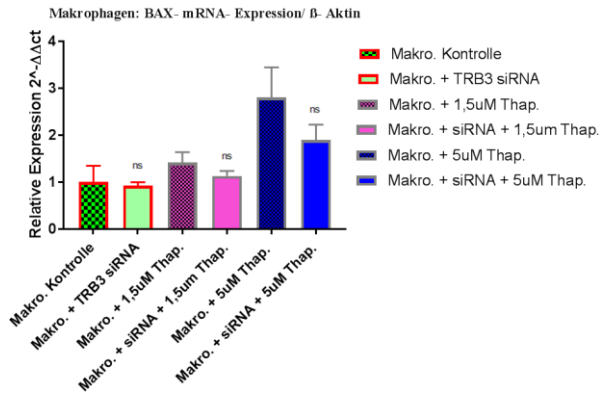


Abb. 37: BAX- mRNA- Expression in differenzierten Makrophagen unter Knockdown und Thapsigargin

Der TRB3- mRNA- Knockdown mit Lipofectamine mit oder ohne nachfolgende Behandlung mit Thapsigargin zeigte bei THP-1- Zellen keine signifikante Änderung der BAX- mRNA- Expression.

Um den Einfluss der TRB3- mRNA auf den Cholesterin- Uptake in THP-1- Zellen und differenzierten Makrophagen zu evaluieren, wurde die Cholesterinaufnahme mittels Fluoreszenzspektrometrie unter verschiedenen Bedingungen erfasst, wie einer TRB3- Stimulation mittels TG, eines TRB3- Knockdowns und einer TG- Induktion nach Knockdown.

4.12 Einfluss der TRB3- Überexpression auf die Cholesterinaufnahme in THP- 1- Zellen und differenzierten Makrophagen

Die Aufnahme von Cholesterin in THP-1- Zellen betrug 2296 (\pm SD 323), in differenzierten Makrophagen 6423 (\pm SD 445). 1,5 μ M TG ließen

in THP-1- Zellen eine leichte (14%), 5uM TG eine leicht signifikante (25%) Abnahme des Cholesterin- Uptakes erkennen (1,5 uM TG: 1966 (\pm SD 352), $p = ns$; 5 uM TG: 1712 (\pm SD 326), $p \leq 0,05$) (Abb. 38).

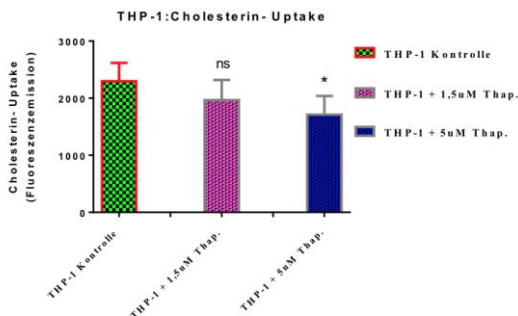


Abb. 38: Cholesterinaufnahme in THP-1-Zellen unter Thapsigargin

Die Thapsigargin Behandlung (1,5 uM oder 5 uM) führte nur unter 5 uM zu einer signifikanten 25%-igen Reduktion der Cholesterin- Aufnahme in THP-1- Zellen.

In differenzierten Makrophagen betrug die Abnahme in der Cholesterinabsorption unter vergleichbarer TG Stimulation 28% bzw. 57% und war somit signifikant (1,5 uM TG: 4648 (\pm SD 479), $p \leq 0,01$; 5 uM TG: 2788 (\pm SD 483), $p \leq 0,0001$) (Abb. 39)

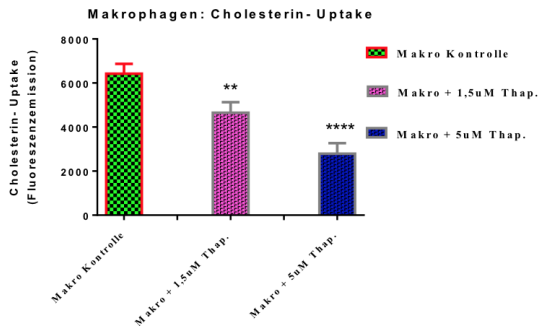


Abb. 39: Cholesterinaufnahme in differenzierten Makrophagen unter Thapsigargin

Die Thapsigargin- Behandlung (1,5 uM oder 5 uM) von differenzierten Makrophagen führte zu einer jeweils signifikanten Reduktion der Cholesterin-Aufnahme um 28% bzw. 57%.

4.13 Einfluss von TRB3- Knockdown (+/- TG- Stimulation) auf den Cholesterin- Uptake in THP-1- Zellen und differenzierten Makrophagen

Der TRB3- Knockdown in THP-1- Zellen ging mit einer Verminderung des Cholesterin- Uptakes von 4% einher (2296 (\pm SD 323) vs. 2206 (\pm SD 457), $p = ns$) (Abb.40).

Der Vergleich von THP-1- Zellen (+/+ siRNA) mit THP-1- Zellen (-/- siRNA) zeigte nach TG-Stimulation (1,5 μ M) im Knockdown eine Reduktion des Cholesterin- Uptakes von 5% (1966 (\pm SD 352) vs. 1873 (\pm SD 644), $p = ns$) (Abb. 40).

Die Inkubation von geknockten THP-1- Zellen (-/- siRNA) mit 5 μ M TG zeigte eine im Vergleich zu THP-1- Zellen (+/+ siRNA) um 3% höhere Cholesterinaufnahme (1712 (\pm SD 326) vs. 1765 (\pm SD 144), $p = ns$) (Abb. 40).

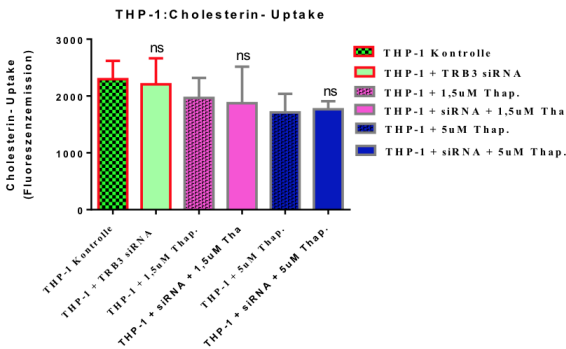


Abb. 40: Cholesterinaufnahme in THP-1- Zellen unter TRB3- Knockdown und Thapsigargin

Der TRB3- Knockdown mit Lipofectamine mit oder ohne nachfolgender Behandlung mit Thapsigargin zeigte bei THP-1- Zellen keine signifikante Änderung in der Cholesterin- Aufnahme.

Der Knockdown von TRB3 in differenzierten Makrophagen zeigte ebenfalls keine signifikante Änderung der Cholesterinaufnahme (-2%) (Makrophagen Kontrolle: 6423 (\pm SD 445) vs. Makrophagen + siRNA: 6317 (\pm SD 788), $p = ns$) (Abb. 41).

Die Zugabe von 1,5 μ M bzw. 5 μ M TG nach Knockdown führte zu einer minimalen Zunahme der Cholesterinaufnahme (4% bzw. 16%) (TG 1,5 μ M: 4648 (\pm SD 479) vs. TG 1,5 μ M + siRNA: 4811 (\pm SD 441), $p = ns$ bzw. TG 5 μ M: 2788 (\pm SD 483) vs. TG 5 μ M + siRNA: 3245 (\pm SD 359), $p = ns$) (Abb. 41).

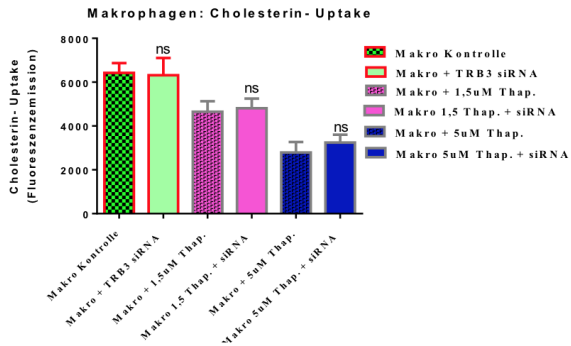


Abb. 41: Cholesterinaufnahme in differenzierten Makrophagen unter Knockdown und Thapsigargin

Der TRB3- Knockdown mit Lipofectamine mit oder ohne nachfolgende Behandlung mit Thapsigargin zeigt bei THP-1- Zellen keine signifikante Änderung der Cholesterin-Aufnahme.

5 Diskussion

Die übermäßige Aufnahme von Cholesterin in Makrophagen führt zur Schaumzellbildung und letztlich zur Apoptose, was der Atherosklerose und der atherosklerotischen Plaquebildung vorausgeht (Fernandez-Hernando et al., 2007; Libby et al., 1996; Shang et al., 2009; Subramanian and Chait, 2009). Ebenso verursacht die übermäßige Aufnahme und Akkumulation von Cholesterin in Makrophagen ER- Stress, was eine Überexpression von TRB3 zur Folge hat und zum Zelltod führt (Koh et al., 2013). Darüber hinaus bewirkt ein TRB3- Knockdown in insulinresistenten Ratten eine Induktion von HDL (Weismann et al., 2011). TRB3 reguliert unter anderem die JNK- Phosphorylierung, die Akt/ MAPK- Signalkaskade (Deng et al., 2009; Du et al., 2003) sowie die Apoptosemarker ATF4, CHOP und BAX (Shimizu et al., 2012; Szegezdi et al., 2006; Tabas and Ron, 2011; Zou et al., 2009). Da die

Cholesterinaufnahme von großer Wichtigkeit für die Zellfunktion ist, stellt sich die Frage ob und inwieweit TRB3 mit der Aufnahme von Cholesterin in Makrophagen korreliert und ob diese Beziehung Einfluss auf das Apoptosegeschehen der Zelle nimmt?

In vorliegender Studie werden THP-1- Zellen und differenzierte Makrophagen verglichen in Bezug auf TRB3- Expression, Cholesterinaufnahme nach TRB3- Knockdown bzw. Stimulation und die Wirkung dieser auf CHOP und BAX.

TRB3- Expression und TRIB3- Gehalt

Die quantitative Darstellung der TRB3- mRNA mittels real time PCR zeigt, dass TRB3 in beiden Zellarten (THP-1 und differenzierten Makrophagen) in sehr geringer Menge exprimiert

ist, wobei die Expression in Makrophagen circa 3-fach höher lag als in THP-1-Zellen (Abb. 18).

Während einer Inflammation wandern zirkulierende Monozyten ins Gewebe, wo sie zu differenzierten Makrophagen reifen. Für eine Differenzierung von THP-1 zu Makrophagen *in vitro* werden Zell-stimulierende Faktoren benötigt. Dabei wurde PMA in der optimalen Konzentration von 400ng über 48h eingesetzt. Tao et al und Via et al berichteten, dass THP-1-Zellen unter PMA-Einfluss ihre Zellmorphologie ändern, eine Makrophagenfunktion erlangen und eine deutliche Induktion von Scavenger-Rezeptoren erfahren (Tao et al., 2009; Via et al., 1989). Shang beschrieb, dass THP-1-Zellen sich auf natürlichem Weg zu Makrophagen entwickelt haben und einen Anstieg in ihrer TRB3-Expression am 3. Tag und eine maximale Steigerung am 7. Tag zeigten (Shang et al., 2009). Akagawa gab an, dass unterschiedliche „colony stimulating factors

(CSF)“ zu differenzierten Makrophagenarten führen, die in ihrer Morphologie, Zelloberflächenantigenexpression und Funktion unterschiedlich sind (Akagawa 2002). Da in vorliegender Untersuchung eine relativ kurze Inkubationszeit für PMA gewählt wurde (48h im Gegensatz zu 72-96h) ist anzunehmen, dass der Anstieg in der TRB3- Expression in differenzierten Makrophagen nicht Ausdruck der akuten Stimulation durch PMA ist, sondern auf einem natürlichen Differenzierungsprozess beruht

Unsere Untersuchung mittels Western- Blot zeigte, dass der Gehalt von TRB3- Protein in beiden Zellreihen gering war. Während in THP-1- Zellen die Proteinbande schwach zu erkennen war, konnte man sie in differenzierten Makrophagen kaum nachweisen, was sich mit den Western- Blot- Ergebnissen von Ohoka und Shang bezüglich TRIB3 in Makrophagen deckt (Ohoka et al., 2005; Shang et al., 2009), (Abb. 19). Dies verhält sich

jedoch gegenläufig zur gemessenen TRB3- mRNA- Expression in diesen Zellen, welche in differenzierten Makrophagen deutlich höher ausfielen als in THP-1- Zellen. Diese Diskrepanz zwischen TRB3- mRNA- Expression und TRIB3- Proteinbildung könnte darauf basieren, dass ein posttranskriptioneller Faktor die TRIB3- Proteinbildung unabhängig von der TRB3- Genexpression reguliert. Humphrey et al konnte zeigen, dass ER- Stress oder Zytokine die Bildung von TRIB3- Protein stimuliert ohne erkennbare Änderung der TRB3- mRNA- Transkription (Humphrey et al., 2010).

TRB3 und Cholesterin- Aufnahme in die Zelle

Um den Einfluss von TRB3 auf die Cholesterinaufnahme in THP-1- Zellen und differenzierte Makrophagen zu prüfen, wurde die Cholesterinaufnahme unter drei

Versuchsbedingungen gemessen: Knockdown von TRB3, Stimulation von TRB3 durch den ER-Stressor Thapsigargin sowie nach TRB3-Knockdown unter Thapsigargin-Stimulation. Die letzte Versuchsreihe war wichtig, da der Knockdown der bereits geringen TRB3-Expression in normalen Zellen zu TRB3- Werten führte, die sich am Rande der Messbarkeit bewegten (Abb. 20 und Abb. 21). Durch Stimulation von TRB3 in den Zellen, mit TG, konnte das Niveau der TRB3- Genexpression gesteigert werden.

TRB3- Knockdown

Das Ausmaß des Knockdowns unter Lipofectamine auf die TRB3- mRNA war in THP- 1- Zellen geringer ausgeprägt als in differenzierten Makrophagen (43% vs 72% Reduktion), (Abb. 20

und 21). Dies ist wohl auf die niedrige basale Expression von TRB3 in THP- 1 zurückzuführen.

1. TRB3- Stimulation mit TG

TG induziert ER- Stress, indem es zur Inhibierung der Ca^{2+} - ATPase (SERCA) führt, was eine Ca^{2+} - Freisetzung aus dem Speicher des endoplasmatischen Retikulums auslöst und eine Störung der ER- Homöostase bewirkt (Lee et al., 2012; Li et al., 1993). In einigen Arbeiten konnte auch gezeigt werden, dass ER- Stress, induziert durch TG, Tunicamycin, oxidative Stressbedingungen und Aminosäuredeprivation zu einem Anstieg der TRB3- Expression führt (Cunard, 2013; Ohoka et al., 2005).

Es war von Interesse, dass die Inkubation mit TG nur über kurze Dauer (6h) durchgeführt wurde, um zu erreichen, dass die TRB3- Expression gesteigert wird ohne gleichzeitig einen ausgeprägten ER- Stress und damit verbunden eine Störung der

Zellhomöostase und eine Zellapoptose hervorzurufen.

Die hier erhobenen Daten zeigten, dass der Anstieg in TRB3- Expression unter TG in beiden Zellarten signifikant war, jedoch mit unterschiedlichem Kurvenverlauf. In THP- 1- Zellen war in niedrigen und mittleren Dosen (0,5- 2 μM) der Anstieg nur moderat und erst bei höchster Dosierung (5 μM) deutlich ausgeprägt. Im Vergleich dazu ließ sich in Makrophagen ein deutlicher, annähernd linearer Anstieg erkennen (Abb. 22 und 23). Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die weniger differenzierten THP- 1 auf äußere Stimuli wie TG oder Knockdown schwächer reagieren als differenzierte Makrophagen und sich dieser Unterschied nur bei starker äußerer Stimulation der THP- 1 annähernd ausgleicht.

Die Tatsache, dass die hohe TG- Dosis von 5 μM im Vergleich zu den niedrigen und moderaten TG-

Dosierungen noch eine deutliche Steigerung (circa 30- fach) der TRB3- Expression bewirken konnte, lässt vermuten, dass der ER- Stress in den gering stimulierten Zellen jeweils moderat war und noch nicht zu einer weitgehenden Apoptose geführt hatte. Ansonsten wären die Zellen nicht mehr in diesem Ausmaß stimulierbar gewesen. Diese Annahme deckt sich mit den Untersuchungen anderer Autoren, die belegen konnten, dass eine Stimulation mit 0,5 uM TG nur mit einer geringen Apoptoserate bei Makrophagen einherging (Devries-Seimon et al., 2005).

Interessanterweise führte eine Stimulation mit TG trotz Knockdown zu einem TRB3- mRNA-Anstieg. Trotzdem war das Ausmaß des TRB3-Knockdowns in normalen wie auch in stimulierten Zellen ähnlich (Abb. 24, 25). Diese Ergebnisse waren im Sinne der Untersuchung erfolgreich, da TG die TRB3- Messbarkeit verbesserte ohne das Ausmaß des Knockdowns zu beeinflussen.

Das Ausmaß des ER- Stresses wurde in einigen anderen Arbeiten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Wirkung von TG nicht nur dosis- sondern auch zeitabhängig ist. So betrug die Apoptoserate in einer Leukämie- Zelllinie K562 unter 8 uM TG nach 24 bzw. 48h 31% bzw. 44% und unter 4 uM TG 23% bzw. 32% (Feng et al., 2006). Dieser zeitabhängige Unterschied könnte einerseits in der Einwirkdauer von TG begründet sein, oder andererseits in einer unterschiedlichen zeitlichen Aktivierung verschiedener TRB3 mRNA- Varianten. Corcoran et al. unterscheiden hierbei zwei TRB3- Hauptvarianten, die numerisch größere TRB3- 1A und die kleinere TRB3- 1B, wobei TG in den ersten vier Stunden zu einer Hochregulierung der ersteren und erst später zu einer Steigerung der letzteren führte (Corcoran et al., 2005; Ord and Ord, 2005). Dies könnte erklären, weshalb ein Unterschied zwischen der

TRB3- RNA- und der TRB3- Protein- Expression in vorliegender Arbeit besteht.

2. Wirkung von TG auf andere Zellparameter

Die TG- Stimulation führt nicht nur zu einem Anstieg von TRB3 sondern auch zur Änderung der Expression anderer Zellparameter, die wiederum die TRB3- Expression beeinflussen und möglicherweise eine Rolle bei der Cholesterinaufnahme spielen. ATF4 wird unter verschiedenen ER- Stressbedingungen wie bei TG- Gabe verstärkt exprimiert (Armstrong et al., 2010; Ohoka et al., 2005; Ord and Ord, 2005).

CHOP ist ein Transkriptionsziel von aktiviertem ATF4 (Oyadomari and Mori, 2004). Die Zellstressindikatoren ATF4 und CHOP kooperieren, indem sie sich an den TRB3- Promotor binden und die TRB3- Expression aktivieren. TRB3 wirkt dann über ein negatives Feedback auf ATF4 und CHOP und reguliert somit

partiell seine eigene Induktion (Jousse et al., 2007; Ohoka et al., 2005; Ord and Ord, 2005).

Auf ähnliche Weise triggert TG die BAX-Expression und bewirkt durch strukturelle Änderungen eine mitochondrial-vermittelte Apoptose (Basu and Haldar, 1998; Corcoran et al., 2005). Die Interaktion zwischen TRB3 und BAX beruht auf der Bildung von MLK3 (mixed lineage kinase 3) unter dem Einfluss von Zytokinen. MLK3 bindet und stabilisiert TRB3, welches als Inhibitor von Akt („prosurvival kinase“) agiert und durch Strukturveränderungen von BAX zur Permeabilitätsänderung der mitochondrialen Membran und zum Zelltod führt (Humphrey et al., 2010).

In Kenntnis dieser interagierenden Regulationsmechanismen war es von Interesse den Effekt einer Stimulation durch TG und eines Knockdowns von TRB3 auf die CHOP und BAX-

Expression zu prüfen. Auf diese Weise wurde versucht, die Interaktion zwischen den genannten Parametern und der Zellviabilität darzustellen, zumal beide, CHOP und BAX, Apoptosemarker sind. Die Zellviabilität ist bedeutsam für die Cholesterinaufnahme in die Zelle.

Die Ergebnisse der rt-PCR zeigten, dass die CHOP-Expression in THP-1-Zellen bzw. differenzierten Makrophagen gering war (0,05 bzw. 0,156) (Abb. 28 und Abb. 29), was im Einklang mit anderen Studien steht (Endo et al., 2006). Die CHOP-Werte ähneln den Werten der TRB3-mRNA-Expression in den jeweiligen Zellarten (0,051 bzw. 0,144), (Abb. 20 und 21). Diese Werte stützen womöglich die Aussage in der Literatur, dass TRB3 an der Regulation der basalen CHOP-Expression in normalen Zellen beteiligt ist. Sie halten sich durch Aktivierung und negative Feedbackmechanismen in einem regulatorischen Gleichgewicht (Jousse et al., 2007; Ohoka et al.,

2005). Diese Beziehung zwischen TRB3 und CHOP zeigte sich auch nach Inkubation mit TG, bei der es zu vergleichbaren Änderungen kam.

BAX zeigte nach TG- Stimulation eine Steigerung der Expression, die jedoch im Vergleich zu TRB3 und CHOP bei allen TG- Konzentrationen schwächer ausfiel. Lediglich unter der höchsten TG- Konzentration von 5 uM war der Anstieg von BAX signifikant (Abb. 32 und 33). Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass TG die Expression von TRB3 und CHOP stimuliert, aber wegen des geringeren Ausmaßes der BAX-Stimulation, diese nicht allein TRB3- und CHOP-abhängig zu sein scheint. Auch suggerieren die Ergebnisse, dass die durch TG- induzierte Apoptose noch nicht sehr ausgeprägt war. Dieser Umstand war von Vorteil, da die TRB3-Stimulation durch TG die Viabilität und die Funktion der Zellen nicht zu sehr beeinträchtigen sollte, um die Cholesterinaufnahme nicht zu stören.

Der Knockdown von TRB3 führte hier zu keiner Änderung in der CHOP und BAX- Expression, was darauf hinweisen könnte, dass die CHOP- Expression nicht allein durch TRB3 reguliert wird.

Cholesterinaufnahme in THP-1- Zellen und differenzierten Makrophagen

In dieser Arbeit wurde die Aufnahme von Cholesterin und nicht die von ox- LDL oder ac- LDL geprüft, da diese LDL-Formen unabhängige Induktoren von ER- Stress sind und damit ebenfalls einen Anstieg von TRB3 verursachen (Liang et al., 2007; Shang et al., 2009; Tao et al., 2009).

Allgemein war die Cholesterinaufnahme in differenzierten Makrophagen circa 3- fach höher als in THP- 1- Zellen (Abb. 38 und 39). Dies könnte darauf beruhen, dass die Anzahl der Scavengerrezeptoren bei Makrophagen höher ist, als bei den weniger differenzierten THP- 1- Zellen. Die Aufnahme von Cholesterin in die Zelle

beruhen auf zwei Mechanismen. Entweder erfolgt sie über LDL- Rezeptoren oder durch Scavenger-Rezeptoren der Makrophagen (Terpstra, van Amersfoort et al. 2000, ZhaoYing Pearlina 2003). Scavengerrezeptoren (CD 36 oder SR- A) sind für 75- 90% der Aufnahme von modifiziertem LDL in Makrophagen verantwortlich (Kunjathoor et al., 2002). Die übrige Cholesterinaufnahme erfolgt über LDL- Rezeptoren (Terpstra et al., 2000; ZhaoYing Pearlina, 2003).

Aus früheren Untersuchungen geht hervor, dass in vitro inkubierte Monozyten innerhalb von 12- 24h eine Zunahme ihrer LDL- Rezeptordichte zeigten, während die Scavengerrezeptorexpression in diesem frühen Stadium der Inkubation noch sehr gering ist. Die Anzahl der Scavengerrezeptoren (CD 36 oder Klasse B) nimmt simultan mit der Reifung der Makrophagen zu, was die Fähigkeit der Zelle Cholesterin aufzunehmen erhöht. (Eder et

al., 2008; Han et al., 1997; Li and Glass, 2002; Matveev et al., 1999).

In dieser Arbeit bewirkte eine Überexpression von TRB3 unter TG einen geringen Rückgang der Cholesterinaufnahme. Während diese Reduktion in THP- 1- Zellen unter 1,5 uM nur als Tendenz (-14%) erkennbar war, wurde diese unter 5 uM signifikant (-25%). Im Vergleich dazu war die Abnahme der Cholesterinabsorption in differenzierten Makrophagen deutlicher ausgeprägt und sowohl unter 1,5 uM (-25%) als auch 5 uM (-57%) signifikant (Abb. 38 und 39). Im Gegensatz dazu führte ein Knockdown von TRB3 mit und ohne nachfolgende TG- Stimulation zu keiner Änderung der Cholesterinaufnahme in beiden Zellarten. Daraus lässt sich schließen, dass die Cholesterinaufnahme in THP- 1 Zellen und differenzierten Makrophagen nicht von TRB3 sondern primär von der TG- Stimulation abhängig ist.

Die Aufnahme von Cholesterin in vivo setzt mehrere Schritte voraus, wie beispielsweise die Rekrutierung, Adhäsion und Migration von Monozyten ins jeweilige Gewebe, deren Reifung zu Makrophagen und die dadurch gesteigerte Phagozytoseaktivität.

TRB3- Knockout in Mäusen bewirkte im Peritonealgewebe eine verminderte Makrophagenmigration, erhöhte Adhäsion und Phagozytose (Wang et al., 2012). Es könnte sein, dass im Gegensatz dazu eine Überexpression von TRB3 durch TG in vitro zu einer verminderten Zellviabilität und Phagozytose führt, zumal TG nicht nur eine Steigerung der TRB3- Expression sondern auch eine CHOP- und BAX-Aktivierung bewirkte. Diese in vitro gefundenen Veränderungen haben möglicherweise zu einer Beeinträchtigung der Phagozytosefähigkeit dieser Zellen geführt.

6 Zusammenfassung

Tribbles 3 (TRIB3) ist eine Pseudokinase, also ein kinaseähnliches Protein welches jedoch keine Kinaseaktivität aufweist, bedingt durch die fehlende ATP- Bindungsdomäne auf Serin/ Threonin. TRB3 vermittelt seine Effekte durch direkte Protein-Protein Interaktion. Neben der Expression in menschlichen Leberzellen zeigt TRB3 auch eine verstärkte Expression in Tumoren der Lunge, des Kolons und der Brust. Zudem weisen insulinresistente Zellen von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 vermehrt TRB3 auf. Es sind vielfältige Interaktionen beschrieben, beispielsweise den Zellzyklus, die Insulinsignaltransduktion oder auch die Aktivität von PPAR γ betreffend.

TRB3 dient als Zielgen für CHOP und ATF4, welche an der ER-stressinduzierten Apoptose in vielen Zellen beteiligt sind, wobei TRB3 durch

negatives Feedback auf CHOP und ATF4 zur Regulation seiner eigenen Expression beiträgt. Folglich nimmt TRIB3 eine wichtige Stellung unter den Regulatoren von Zellüberleben und Zelltod unter ER- Stressbedingungen ein.

ER- Stress ist an der Entwicklung von Insulinresistenz und neurodegenerativen Erkrankungen (z. B. M. Alzheimer, M. Parkinson, Ischämischen Insulten) beteiligt. Experimentell kann ER-Stress pharmakologisch mit Thapsigargin oder Tunicamycin induziert werden.

Da TRIB3 bekanntlich auf Zellprozesse wirkt, war es Ziel dieser Untersuchung zu prüfen, inwieweit das Vorhandensein sowie unterschiedliche Konzentrationen an TRIB3 Einfluss auf die Cholesterinaufnahme in THP1- Zellen und Makrophagen nehmen und ob diese Aufnahme vom ER- Stress abhängig ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sowohl THP-1- Zellen als auch differenzierte Makrophagen TRB3 in geringer Menge aufweisen. Bei einer Stimulation der Zellen mit Thapsigargin zeigt sich eine dosisabhängige Zunahme von TRB3, CHOP und BAX in beiden Zelltypen, wobei die Effekte bei Makrophagen stärker ausgeprägt waren. Während Thapsigargin die TRB3-Konzentration in THP-1- Zellen und differenzierten Makrophagen auch unter Knockdownbedingungen erhöhte, unterschied sich das Ausmaß des Knockdowneffektes dabei nicht wesentlich von dem bei unbehandelten, nicht- Thapsigargin stimulierten Zellen. Es scheint, dass die CHOP- und BAX- Regulation nicht allein TRB3- abhängig ist, da ein signifikanter Knockdown von TRB3 nur mit einer tendentiellen Verminderung von BAX und einer leichten, ebenfalls nicht- signifikanten Erhöhung von CHOP einherging. Unter der Behandlung mit Thapsigargin zeigte sich bei

beiden Zelltypen eine dosisabhängige Reduktion der Cholesterinaufnahme, wobei diese TRB3-unabhängig erscheint, zumal sich bei TRB3-Knockdown keine signifikante Änderung in der Cholesterinaufnahme erkennen ließ.

Da ein Zusammenhang zwischen Cholesterin, Makrophagen, Schaumzellbildung und der Entstehung atherosklerotischer Plaques postuliert wird und TRB3 die Cholesterinaufnahme in die Zelle aufgrund vorliegender Daten nicht signifikant beeinflusst, bleibt es weiteren Studien vorbehalten zu prüfen, welche Regulatorgene bzw.-enzyme primär zur Cholesterinüberladung der Zellen bei Atherosklerose beitragen, um daraus einen präventiv-therapeutischen Ansatz für die Artherosklerose zu entwickeln.

7 Literaturverzeichnis

Armstrong, J.L., Flockhart, R., Veal, G.J., Lovat, P.E., and Redfern, C.P. (2010). Regulation of endoplasmic reticulum stress-induced cell death by ATF4 in neuroectodermal tumor cells. *The Journal of biological chemistry* 285, 6091-6100.

Basu, A., and Haldar, S. (1998). The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. *Molecular human reproduction* 4, 1099-1109.

Bio-Rad Laboratories, I. (2006). Real-Time PCR Applications Guide. 37-44.

Bowers, A.J., Scully, S., and Boylan, J.F. (2003). SKIP3, a novel Drosophila tribbles ortholog, is overexpressed in human tumors and is regulated by hypoxia. *Oncogene* 22, 2823-2835.

Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1979). Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 3330-3337.

Bukrinsky, M., and Sviridov, D. (2006). Human immunodeficiency virus infection and macrophage cholesterol metabolism. *Journal of leukocyte biology* 80, 1044-1051.

Cascieri, M.A. (2002). The potential for novel anti-inflammatory therapies for coronary artery disease. *Nature reviews Drug discovery* 1, 122-130.

Classen, A., Lloberas, J., and Celada, A. (2009). Macrophage activation: classical versus alternative. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) *531*, 29-43.

Cohen, J.C., Vega, G.L., and Grundy, S.M. (1999). Hepatic lipase: new insights from genetic and metabolic studies. *Current opinion in lipidology* *10*, 259-267.

Corcoran, C.A., Luo, X., He, Q., Jiang, C., Huang, Y., and Sheikh, M.S. (2005). Genotoxic and endoplasmic reticulum stresses differentially regulate TRB3 expression. *Cancer biology & therapy* *4*, 1063-1067.

Cowan, K.J., and Storey, K.B. (2003). Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *The Journal of experimental biology* *206*, 1107-1115.

Cravero, J.D., Carlson, C.S., Im, H.J., Yammani, R.R., Long, D., and Loeser, R.F. (2009). Increased expression of the Akt/PKB inhibitor TRB3 in osteoarthritic chondrocytes inhibits insulin-like growth factor 1-mediated cell survival and proteoglycan synthesis. *Arthritis and rheumatism* *60*, 492-500.

Cunard, R. (2013). Mammalian Tribbles Homologs at the Crossroads of Endoplasmic Reticulum Stress and Mammalian Target of Rapamycin Pathways. *Scientifica* *2013*, 750871.

Curtiss, L.K., and Boisvert, W.A. (2000). Apolipoprotein E and atherosclerosis. *Current opinion in lipidology* *11*, 243-251.

Demers, A., Rodrigue-Way, A., and Tremblay, A. (2008). Hexarelin Signaling to PPARgamma in Metabolic Diseases. *PPAR research* *2008*, 364784.

Deng, J., James, C.H., Patel, L., Smith, A., Burnand, K.G., Rahmoune, H., Lamb, J.R., and Davis, B. (2009). Human tribbles homologue 2 is expressed in unstable regions of carotid plaques and regulates macrophage IL-10 in vitro. *Clinical science (London, England : 1979)* *116*, 241-248.

Desmouliere, A., Redard, M., Darby, I., and Gabbiani, G. (1995). Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *The American journal of pathology* *146*, 56-66.

Devries-Seimon, T., Li, Y., Yao, P.M., Stone, E., Wang, Y., Davis, R.J., Flavell, R., and Tabas, I. (2005). Cholesterol-induced macrophage apoptosis requires ER stress pathways and engagement of the type A scavenger receptor. *The Journal of cell biology* *171*, 61-73.

Du, K., Herzig, S., Kulkarni, R.N., and Montminy, M. (2003). TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science (New York, NY)* *300*, 1574-1577.

Duffield, J.S., Ware, C.F., Ryffel, B., and Savill, J. (2001). Suppression by apoptotic cells defines tumor necrosis factor-mediated induction of glomerular mesangial cell apoptosis by activated macrophages. *The American journal of pathology* *159*, 1397-1404.

Eder, K., Guan, H., Sung, H.Y., Francis, S.E., Crossman, D.C., and Kiss-Toth, E. (2008). LDL uptake by monocytes in response to inflammation is MAPK dependent but independent of tribbles protein expression.

Immunology letters *116*, 178-183.

Endo, M., Mori, M., Akira, S., and Gotoh, T. (2006). C/EBP homologous protein (CHOP) is crucial for the

induction of caspase-11 and the pathogenesis of lipopolysaccharide-induced inflammation. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950) *176*, 6245-6253. Feng, X.Q., You, Y., Xiao, J., and Zou, P. (2006).

[Thapsigargin-induced apoptosis of K562 cells and its mechanism]. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi / Zhongguo bing li sheng li xue hui = Journal of experimental hematology / Chinese Association of Pathophysiology* *14*, 25-30.

Fernandez-Hernando, C., Ackah, E., Yu, J., Suarez, Y., Murata, T., Iwakiri, Y., Prendergast, J., Miao, R.Q., Birnbaum, M.J., and Sessa, W.C. (2007). Loss of Akt1 leads to severe atherosclerosis and occlusive coronary artery disease. *Cell metabolism* *6*, 446-457.

Freissmuth M, B.S., Offermanns S. (2012).

Pharmakologie und Toxikologie: Von molekularen Grundlagen zur Pharmatherapie. In (Deutschland: Axel Springer Verlag), pp. 452- 471.

Gaw A, M.M., Cowan R, O' Reily D, Stewart M, Shepherd J. (2004). *Clinical Biochemistry- An illustrated colour text*. In (Churchill Livingstone).

Gibbons, G.F. (1990). Assembly and secretion of hepatic very-low-density lipoprotein. *The Biochemical journal* *268*, 1-13.

Gibbs, D.F., Warner, R.L., Weiss, S.J., Johnson, K.J., and Varani, J. (1999). Characterization of matrix metalloproteinases produced by rat alveolar macrophages. *American journal of respiratory cell and molecular biology* *20*, 1136-1144.

Gimpl, G., Burger, K., and Fahrenholz, F. (1997). Cholesterol as modulator of receptor function. *Biochemistry* 36, 10959-10974.

Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343, 425-430.

Goldstein, J.L., DeBose-Boyd, R.A., and Brown, M.S. (2006). Protein sensors for membrane sterols. *Cell* 124, 35-46.

Goluszko, P., and Nowicki, B. (2005). Membrane cholesterol: a crucial molecule affecting interactions of microbial pathogens with mammalian cells. *Infection and immunity* 73, 7791-7796.

Gordon, D.A., and Jamil, H. (2000). Progress towards understanding the role of microsomal triglyceride transfer protein in apolipoprotein-B lipoprotein assembly. *Biochimica et biophysica acta* 1486, 72-83.

Gotoh, T., Terada, K., Oyadomari, S., and Mori, M. (2004). hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell death and differentiation* 11, 390-402.

Greaves DR (2001). Macrophage Scavenger Receptors. <http://userspathoxacuk/~greaves/drgscavshtml>
<http://users.path.ox.ac.uk/~greaves/index.html>.

Grosshans, J., and Wieschaus, E. (2000). A genetic link between morphogenesis and cell division during formation of the ventral furrow in *Drosophila*. *Cell* 101, 523-531.

Gupta, A.K., Sexton, R.C., and Rudney, H. (1989). Effect of vitamin D3 derivatives on cholesterol synthesis and

HMG-CoA reductase activity in cultured cells. *Journal of lipid research* 30, 379-386.

Han, J., Hajjar, D.P., Febbraio, M., and Nicholson, A.C. (1997). Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36. *The Journal of biological chemistry* 272, 21654-21659.

Hegedus, Z., Czibula, A., and Kiss-Toth, E. (2006).

Tribbles: novel regulators of cell function; evolutionary aspects. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 63, 1632-1641.

Hegedus, Z., Czibula, A., and Kiss-Toth, E. (2007).

Tribbles: a family of kinase-like proteins with potent signalling regulatory function. *Cellular signalling* 19, 238-250.

Holmes, K.C., Popp, D., Gebhard, W., and Kabsch, W. (1990). Atomic model of the actin filament. *Nature* 347, 44-49.

Humphrey, R.K., Newcomb, C.J., Yu, S.M., Hao, E., Yu, D., Krajewski, S., Du, K., and Jhala, U.S. (2010). Mixed lineage kinase-3 stabilizes and functionally cooperates with TRIBBLES-3 to compromise mitochondrial integrity in cytokine-induced death of pancreatic beta cells. *The Journal of biological chemistry* 285, 22426-22436.

Janeway, C.A., Jr. (1992). The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunology today* 13, 11-16.

Jousse, C., Deval, C., Maurin, A.C., Parry, L., Cherasse, Y., Chaveroux, C., Lefloch, R., Lenormand, P., Bruhat, A., and Fafournoux, P. (2007). TRB3 inhibits the transcriptional activation of stress-regulated genes by a

negative feedback on the ATF4 pathway. *The Journal of biological chemistry* **282**, 15851-15861.

Kanwar, Y.S. (2010). TRB3: an oxidant stress-induced pseudokinase with a potential to negatively modulate MCP-1 cytokine in diabetic nephropathy. *American journal of physiology Renal physiology* **299**, F963-964.

Kipari, T., and Hughes, J. (2002). Macrophage-mediated renal cell death. *Kidney international* **61**, 760-761.

Klingenspor, M., Xu, P., Cohen, R.D., Welch, C., and Reue, K. (1999). Altered gene expression pattern in the fatty liver dystrophy mouse reveals impaired insulin-mediated cytoskeleton dynamics. *The Journal of biological chemistry* **274**, 23078-23084.

Koh, H.J., Toyoda, T., Didesch, M.M., Lee, M.Y., Sleeman, M.W., Kulkarni, R.N., Musi, N., Hirshman, M.F., and Goodyear, L.J. (2013). Tribbles 3 mediates endoplasmic reticulum stress-induced insulin resistance in skeletal muscle. *Nature communications* **4**, 1871.

Krieger, M. (1992). Molecular flypaper and atherosclerosis: structure of the macrophage scavenger receptor. *Trends in biochemical sciences* **17**, 141-146.

Krieger, M. (1999). Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Annual review of biochemistry* **68**, 523-558.

Kunjathoor, V.V., Febbraio, M., Podrez, E.A., Moore, K.J., Andersson, L., Koehn, S., Rhee, J.S., Silverstein, R., Hoff, H.F., and Freeman, M.W. (2002). Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in

macrophages. *The Journal of biological chemistry* 277, 49982-49988.

Kzhyshkowska, J., Neyen, C., and Gordon, S. (2012).

Role of macrophage scavenger receptors in atherosclerosis. *Immunobiology* 217, 492-502.

Lee, W.K., Chakraborty, P.K., Roussa, E., Wolff, N.A., and Thevenod, F. (2012). ERK1/2-dependent bestrophin-3 expression prevents ER-stress-induced cell death in renal epithelial cells by reducing CHOP. *Biochimica et biophysica acta* 1823, 1864-1876.

Li, A.C., and Glass, C.K. (2002). The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nature medicine* 8, 1235-1242.

Li, W.W., Alexandre, S., Cao, X., and Lee, A.S. (1993). Transactivation of the *grp78* promoter by Ca^{2+} depletion. A comparative analysis with A23187 and the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase inhibitor thapsigargin. *The Journal of biological chemistry* 268, 12003-12009.

Liang, C.P., Han, S., Senokuchi, T., and Tall, A.R. (2007). The macrophage at the crossroads of insulin resistance and atherosclerosis. *Circulation research* 100, 1546-1555.

Libby, P., Geng, Y.J., Aikawa, M., Schoenbeck, U., Mach, F., Clinton, S.K., Sukhova, G.K., and Lee, R.T. (1996). Macrophages and atherosclerotic plaque stability. *Current opinion in lipidology* 7, 330-335.

Liew, C.W., Bochenski, J., Kawamori, D., Hu, J., Leech, C.A., Wanic, K., Malecki, M., Warram, J.H., Qi, L., Krolewski, A.S., *et al.* (2010). The pseudokinase tribbles homolog 3 interacts with ATF4 to negatively regulate

insulin exocytosis in human and mouse beta cells. *The Journal of clinical investigation* *120*, 2876-2888.

Lim, W.S., Timmins, J.M., Seimon, T.A., Sadler, A., Kolodgie, F.D., Virmani, R., and Tabas, I. (2008). Signal transducer and activator of transcription-1 is critical for apoptosis in macrophages subjected to endoplasmic reticulum stress in vitro and in advanced atherosclerotic lesions in vivo. *Circulation* *117*, 940-951.

Liscum, L. (2008). Chapter 14 - Cholesterol biosynthesis. In *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (Fifth Edition)*, D.E. Vance, and J.E. Vance, eds. (San Diego: Elsevier), pp. 409-431.

Liu, J., Wu, X., Franklin, J.L., Messina, J.L., Hill, H.S., Moellering, D.R., Walton, R.G., Martin, M., and Garvey, W.T. (2010). Mammalian Tribbles homolog 3 impairs insulin action in skeletal muscle: role in glucose-induced insulin resistance. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* *298*, E565-576.

Loinard, C., Zouggari, Y., Rueda, P., Ramkhelawon, B., Cochain, C., Vilar, J., Recalde, A., Richart, A., Charue, D., Duriez, M., *et al.* (2012). C/EBP homologous protein-10 (CHOP-10) limits postnatal neovascularization through control of endothelial nitric oxide synthase gene expression. *Circulation* *125*, 1014-1026.

Matveev, S., van der Westhuyzen, D.R., and Smart, E.J. (1999). Co-expression of scavenger receptor-BI and caveolin-1 is associated with enhanced selective cholesteryl ester uptake in THP-1 macrophages. *Journal of lipid research* *40*, 1647-1654.

Mayumi-Matsuda, K., Kojima, S., Suzuki, H., and Sakata, T. (1999). Identification of a novel kinase-like gene induced during neuronal cell death. *Biochemical and biophysical research communications* 258, 260-264.

McCullough, K.D., Martindale, J.L., Klotz, L.O., Aw, T.Y., and Holbrook, N.J. (2001). Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Molecular and cellular biology* 21, 1249-1259.

Mehta, J.L., Sanada, N., Hu, C.P., Chen, J., Dandapat, A., Sugawara, F., Satoh, H., Inoue, K., Kawase, Y., Jishage, K., *et al.* (2007). Deletion of LOX-1 reduces atherogenesis in LDLR knockout mice fed high cholesterol diet. *Circulation research* 100, 1634-1642.

Moore, K.J., and Freeman, M.W. (2006). Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26, 1702-1711.

Nanoff C. Vorlesung: Pharmakologie und Hyperlipidämie (Med. Uni Wien).

Nemecz G. Course 308: Atherosclerosis part 4. In *Clinical biochemistry lectures* (USA: Campbell University).

Ohoka, N., Yoshii, S., Hattori, T., Onozaki, K., and Hayashi, H. (2005). TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *The EMBO journal* 24, 1243-1255.

Oltvai, Z.N., Milliman, C.L., and Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved

homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**, 609-619.

Orci, L., Montesano, R., Meda, P., Malaisse-Lagae, F., Brown, D., Perrelet, A., and Vassalli, P. (1981). Heterogeneous distribution of filipin-cholesterol complexes across the cisternae of the Golgi apparatus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**, 293-297.

Ord, D., and Ord, T. (2005). Characterization of human NIPK (TRB3, SKIP3) gene activation in stressful conditions. *Biochemical and biophysical research communications* **330**, 210-218.

Oyadomari, S., and Mori, M. (2004). Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell death and differentiation* **11**, 381-389.

Peixoto, P.M., Lue, J.K., Ryu, S.Y., Wroble, B.N., Sible, J.C., and Kinnally, K.W. (2011). Mitochondrial apoptosis-induced channel (MAC) function triggers a Bax/Bak-dependent bystander effect. *The American journal of pathology* **178**, 48-54.

Prudente, S., Scarpelli, D., Chandalia, M., Zhang, Y.Y., Morini, E., Del Guerra, S., Perticone, F., Li, R., Powers, C., Andreozzi, F., *et al.* (2009). The TRIB3 Q84R polymorphism and risk of early-onset type 2 diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **94**, 190-196.

Ramon Goni, P.G., Sylvain Foissac (2009). The qPCR data statistical analysis. *Integromics White Paper*, 1-9.

Rathmell, J.C., Fox, C.J., Plas, D.R., Hammerman, P.S., Cinalli, R.M., and Thompson, C.B. (2003). Akt-directed glucose metabolism can prevent Bax conformation

change and promote growth factor-independent survival. *Molecular and cellular biology* 23, 7315-7328.

Renz H (2003). *Chemie und Laboratoriumsmedizin, Pathophysiologie, Pathobiochemie, Hämatologie*. In (Berlin: Walter de Gruyter und Co.), p. 70.

Ross JA, A.M. (2002). The macrophage. In, L.C. Burke B, ed. (United Kingdom: Oxford University Press), pp. 1-22.

Schmittgen, T.D., and Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protocols* 3, 1101-1108.

Schroder, M., and Kaufman, R.J. (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annual review of biochemistry* 74, 739-789.

Seher, T.C., and Leptin, M. (2000). Tribbles, a cell-cycle brake that coordinates proliferation and morphogenesis during *Drosophila* gastrulation. *Current biology : CB* 10, 623-629.

Selim, E., Frkanec, J.T., and Cunard, R. (2007). Fibrates upregulate TRB3 in lymphocytes independent of PPAR alpha by augmenting CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBP beta) expression. *Molecular immunology* 44, 1218-1229.

Shang, Y.Y., Wang, Z.H., Zhang, L.P., Zhong, M., Zhang, Y., Deng, J.T., and Zhang, W. (2009). TRB3, upregulated by ox-LDL, mediates human monocyte-derived macrophage apoptosis. *The FEBS journal* 276, 2752-2761.

Shi, Y., Chen, J., Weng, C., Chen, R., Zheng, Y., Chen, Q., and Tang, H. (2003). Identification of the protein-protein contact site and interaction mode of human

VDAC1 with Bcl-2 family proteins. *Biochemical and biophysical research communications* 305, 989-996.

Shimizu, K., Takahama, S., Endo, Y., and Sawasaki, T. (2012). Stress-inducible caspase substrate TRB3 promotes nuclear translocation of procaspase-3. *PLoS one* 7, e42721.

Siegenthaler W, B.H. (2006). *Klinische Pathophysiologie*. In (Stuttgart: Georg Thieme Verlag), pp. 137- 147.

Stein, M., Keshav, S., Harris, N., and Gordon, S. (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *The Journal of experimental medicine* 176, 287-292.

Subramanian, S., and Chait, A. (2009). The effect of dietary cholesterol on macrophage accumulation in adipose tissue: implications for systemic inflammation and atherosclerosis. *Current opinion in lipidology* 20, 39-44.

Sung, H.Y., Francis, S.E., Crossman, D.C., and Kiss-Toth, E. (2006). Regulation of expression and signalling modulator function of mammalian tribbles is cell-type specific. *Immunology letters* 104, 171-177.

Szegezdi, E., Logue, S.E., Gorman, A.M., and Samali, A. (2006). Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO reports* 7, 880-885.

Tabas, I. (2005). Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25, 2255-2264.

Tabas, I., and Ron, D. (2011). Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nature cell biology* *13*, 184-190.

Takahashi K (2001). Development and differentiation of macrophages and related cells: Historical review and current concepts. *J Clin and Experimental Haematopathology* *41*, 133.

Tall, A.R., Costet, P., and Wang, N. (2002). Regulation and mechanisms of macrophage cholesterol efflux. *The Journal of clinical investigation* *110*, 899-904.

Tao, J.L., Ruan, X.Z., Li, H., Li, X.M., Moorhead, J.F., Varghese, Z., and Li, X.W. (2009). Endoplasmic reticulum stress is involved in acetylated low-density lipoprotein induced apoptosis in THP-1 differentiated macrophages. *Chinese medical journal* *122*, 1794-1799.

Terpstra, V., van Amersfoort, E.S., van Velzen, A.G., Kuiper, J., and van Berkel, T.J. (2000). Hepatic and extrahepatic scavenger receptors: function in relation to disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* *20*, 1860-1872.

Venkateswaran, A., Laffitte, B.A., Joseph, S.B., Mak, P.A., Wilpitz, D.C., Edwards, P.A., and Tontonoz, P. (2000). Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *97*, 12097-12102.

Via, D.P., Pons, L., Dennison, D.K., Fanslow, A.E., and Bernini, F. (1989). Induction of acetyl-LDL receptor activity by phorbol ester in human monocyte cell line THP-1. *Journal of lipid research* *30*, 1515-1524.

Voet D, V.J. (1995). Biochemistry. In (Pennsylvania, USA: Wiley and Son's), pp. 694- 704.

Voll, R.E., Herrmann, M., Roth, E.A., Stach, C., Kalden, J.R., and Girkontaite, I. (1997). Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* *390*, 350-351.

Wang, Z.H., Shang, Y.Y., Zhang, S., Zhong, M., Wang, X.P., Deng, J.T., Pan, J., Zhang, Y., and Zhang, W. (2012). Silence of TRIB3 suppresses atherosclerosis and stabilizes plaques in diabetic ApoE^{-/-}/LDL receptor^{-/-} mice. *Diabetes* *61*, 463-473.

Waterham, H.R. (2002). Inherited disorders of cholesterol biosynthesis. *Clinical genetics* *61*, 393-403.

Weismann, D., Erion, D.M., Ignatova-Todorava, I., Nagai, Y., Stark, R., Hsiao, J.J., Flannery, C., Birkenfeld, A.L., May, T., Kahn, M., *et al.* (2011). Knockdown of the gene encoding *Drosophila* tribbles homologue 3 (Trib3) improves insulin sensitivity through peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) activation in a rat model of insulin resistance. *Diabetologia* *54*, 935-944.

Wolter, K.G., Hsu, Y.T., Smith, C.L., Nechushtan, A., Xi, X.G., and Youle, R.J. (1997). Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *The Journal of cell biology* *139*, 1281-1292.

Yacoub Wasef, S.Z., Robinson, K.A., Berkaw, M.N., and Buse, M.G. (2006). Glucose, dexamethasone, and the unfolded protein response regulate TRB3 mRNA expression in 3T3-L1 adipocytes and L6 myotubes. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* *291*, E1274-1280.

Yamaguchi, H., Chen, J., Bhalla, K., and Wang, H.G. (2004). Regulation of Bax activation and apoptotic response to microtubule-damaging agents by p53 transcription-dependent and -independent pathways. *The Journal of biological chemistry* 279, 39431-39437.

Zhang, W., Zhong, M., Tang, M.X., Ma, X., Miao, Y., Sun, H., and Zhang, Y. (2006). [Effect of valsartan on Tribble 3 gene expression in rats with experimental diabetic cardiomyopathy]. *Zhonghua xin xue guan bing za zhi* 34, 212-216.

ZhaoYing Pearline, T. (2003). *The Role of Macrophages in Apoptosis:*

Initiator, Regulator, Scavenger. Reviews in Undergraduate Research Vol. 2, 7-11.

Zou, C.G., Cao, X.Z., Zhao, Y.S., Gao, S.Y., Li, S.D., Liu, X.Y., Zhang, Y., and Zhang, K.Q. (2009). The molecular mechanism of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in PC-12 neuronal cells: the protective effect of insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 150, 277-285.

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Allolio (†), Direktor der Endokrinologischen Abteilung am Universitätsklinikum Würzburg, möchte ich mich herzlichst für die Möglichkeit der Dissertation auf dem Gebiet der experimentellen Medizin bedanken. Ein großes Dankeschön geht auch an meinen fakultätsinternen Betreuer Herrn Priv.-Doz. Dirk Weismann, der mir als erfahrener Mentor, durch seine Ratschläge und seine kritische und zugleich konstruktive Meinung zur Seite stand. Seine zielführenden Anregungen waren für die Verwirklichung meiner Arbeit von großer Hilfe.

Ferner möchte ich meinen besonderen Dank an Frau Dr. Britta Heinze richten, die durch ihr umfangreiches Wissen im Bereich der medizinisch-biologischen Forschung für mich eine stets

kompetente Ansprechpartnerin und durch ihren Ideenreichtum bei der Suche nach Lösungsansätzen eine große Stütze war. Gleiches gilt für Herrn Dr. Silviu Sbiera, der mir durch eine Vielzahl von Ideen und Gedankenanstößen sehr geholfen hat.

Für die sachkundige Unterstützung bei der Erlernung von Arbeitsschritten und deren praktischer Umsetzung im Labor geht mein Dank an Frau Martina Zink, Frau Katharina Henzel, Frau Melanie Beyer und Frau Sonja Steinhauer.

Abschließend möchte ich erwähnen, dass zum Gelingen einer guten Arbeit die Umstände und das Umfeld ebenfalls stimmen müssen. Dies war mir durch eine schöne Studienzeit an der Universität Würzburg gegeben, in der ich neben meiner sehr guten medizinisch-akademischen Ausbildung auch viele nette und interessante Kommilitonen kennengelernt habe, von denen ich heute einige zu

meinen Freunden zählen darf. Die mit Ihnen geführten Gespräche waren für mich immer wieder Ansporn und Aufmunterung für die Bewältigung anstehender Aufgaben, wofür ich mich bei allen Beteiligten herzlich bedanke.