

I. Medizinische Klinik und Poliklinik der
Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig)

**Interleukin-6 Freisetzung in der Arteriosklerose und im akuten Myokardinfarkt:
Bedeutung der VCAM-1 regulierten Endothelzell-Monozyten Interaktion für die
Aktivierung von NF- κ B und die Expression von Interleukin-1 β und Interleukin-6**

Katharina Elisabeth Maria Schipek

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. A. Kastrati
2. Privatdozent Dr. K. Brand

Die Dissertation wurde am 31.01.2002 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin
am 17.07.2002 angenommen.

MEINEN ELTERN

Veröffentlichung

Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht.

Dietlind Zohlhöfer, Korbinian Brand, Katharina Schipek, Gisela Pogatsa-Murray, Albert Schömig, Franz-Josef Neumann

Adhesion of Monocyte Very Late Antigen-4 to Endothelial Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Induces Interleukin-1 β -Dependent Expression of Interleukin-6 in Endothelial Cells

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000; 20:353-359

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Entzündung in der Arteriosklerose und im akuten Myokardinfarkt	1
1.2	Zytokine in der Arteriosklerose und im akuten Myokardinfarkt	4
1.3	Die Interaktion von Leukozyten und Endothelzellen	8
1.4	NF- κ B und Entzündungsvorgänge im akuten Myokardinfarkt	11
1.5	Fragestellung und Ziel der Arbeit	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Endotoxintest	15
2.2	Zellkultur	15
2.2.1	Zellkulturmaterialien	15
2.2.2	Antikörper	16
2.2.3	Permanente Zelllinien	16
2.3	Isolation von mononukleären Zellen	17
2.4	Isolation von Monozyten	18
2.5	Inkubation von Endothelzellen mit mononukleären Zellen bzw. Monozyten	18
2.6	Inkubation von Endothelzellen mit Infarktplasmen	20
2.7	Durchflußzytometrie	20
2.8	ELISA	21
2.9	Western Blot	21
2.10	RNA-Präparation	22
2.10.1	RNA-Isolation aus eukaryonten Zellen und Gewebe	22
2.10.2	RNA-Konzentrationsbestimmung	23
2.11	Northern Blot	24
2.11.1	Denaturierung und Auftrennung der RNA	24

2.11.2	Blotting der RNA auf Nylonmembranen	24
2.11.3	Radioaktive Markierung der DNA-Sonden	25
2.11.4	Hybridisierung der Blots	25
2.12	Gelretardierungsassay	26
2.12.1	Isolierung nukleärer und zytosolischer Extrakte	26
2.12.2	Gelretardierungsassay	27
2.13	Statistik	28
3	Ergebnisse	29
3.1	Nachweis der IL-6- und IL-1 β Freisetzung in der Kokultivierung von Endothelzellen mit mononukleären Zellen bzw. Monozyten	29
3.1.1	Nachweis der IL-6 Freisetzung in der Kokultivierung von Endothelzellen mit mononukleären Zellen	29
3.1.2	Nachweis der IL-6 Freisetzung als IL-1 β abhängiger Prozeß	30
3.1.3	Kinetik der Freisetzung von IL-6 und IL-1 β	31
3.1.4	Nachweis der IL-6 mRNA und der IL-1 β mRNA nach Kokultivierung von mononukleären Zellen mit ECV-304	33
3.2	Hemmung der IL-1 β - und IL-6 Freisetzung durch Blockierung der Adhäsion	35
3.2.1	Immunfluoreszenzmessung von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen	35
3.2.2	Hemmung der IL-1 β - und IL-6 Freisetzung durch mechanische Blockade der Adhäsion und durch adhäsionsinhibierende Antikörper	35
3.3	Nachweis der NF- κ B Aktivierung in der Kokultivierung von Endothelzellen mit mononukleären Zellen	38

3.4	Nachweis der endothelialen IL-6 Freisetzung nach Stimulation mit Plasmen von Patienten mit akutem Myokardinfarkt	39
4	Diskussion	41
4.1	IL-6- und IL-1 β Freisetzung in der Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen	41
4.2	Endotheliale IL-6 Produktion als IL-1 β abhängiger Prozeß	42
4.3	Freisetzung von Zytokinen als adhäsionsabhängiger Prozeß	43
4.4	NF- κ B Aktivierung als adhäsionsbedingter Prozeß	45
4.5	Endotheliale IL-6 Freisetzung in Patienten mit akutem Myokardinfarkt	47
4.6	Klinische und therapeutische Ausblicke	48
5	Zusammenfassung	52
6	Literaturverzeichnis	54
7	Abkürzungen	80
8	Danksagung	83
9	Lebenslauf	84

1 Einleitung

1.1 Entzündung in der Arteriosklerose und im akuten Myokardinfarkt

Seit mehr als 60 Jahren ist bekannt, daß die Ischämie im akuten Myokardinfarkt zu einer Entzündungsreaktion führt (Mallory et al 1939). Unter Entzündung versteht man aus physiologischer Sicht eine komplexe Reaktion des Gefäß- und Bindegewebes auf eine Schädigung, um unter Einbindung des Immunsystems die schädigenden Einflüsse zu neutralisieren. Dieser auch als Akute-Phase-Reaktion bezeichneter Vorgang dient nicht nur zur lokalen Schadensbegrenzung, sondern auch dazu, mittels einer generalisierten Reaktion den Organismus auf eine Schädigung vorzubereiten und die Reparatur einzuleiten (Thomas 1992). Beim Myokardinfarkt kommt es durch einen thrombotischen Gefäßverschluß zu einer Ischämie und dadurch zu einer Nekrose der Herzmuskulatur (Riede et Schaefer 1995). Die zugrundeliegende Erkrankung ist dabei im allgemeinen eine Arteriosklerose der Koronararterien. Neueste Untersuchungen zeigen, daß bereits die Arteriosklerose der Koronararterien sowohl zu einer lokalen als auch systemischen Entzündung führt (Ross et al 1999). Die systemische Entzündungsreaktion ist im Blut durch eine Leukozytose, eine erhöhte Blutkörperchensenkungs-Reaktion und durch erhöhte Werte des C-reaktiven Proteins gekennzeichnet. Das CRP ist ein Akute-Phase-Protein und wird bei einer systemischen Entzündung in der Leber synthetisiert. Ungefähr 24 Stunden nach dem Auftreten klinischer Symptome können erhöhte Konzentrationen gemessen werden, deren Höhe dem Entzündungsmaß entspricht (Thomas 1992).

Es hat sich herausgestellt, daß das Ausmaß der Immunantwort ein ungünstiger prognostischer Marker für die ischämiebedingte Herzkrankheit ist (Friedman et al 1974, Yarnell et al 1991, Liuzzo et al 1994): Der Plasmaspiegel des CRP korreliert bei Patienten mit instabiler Angina pectoris mit dem Risiko für das wiederholte Auftreten ischämischer Ereignisse (Liuzzo et al 1994) und dem

Risiko für einen Myokardinfarkt (Thompson et al 1995). Bei gesunden Personen gehen CRP-Plasmawerte im oberen Normbereich mit einem höheren Risiko für einen Myokardinfarkt und einen Schlaganfall einher (Ridker et al 1997).

Ferner ist bei Postinfarktpatienten die Anzahl an zirkulierenden Leukozyten von prognostischer Bedeutung. So korreliert das Reinfarkt-Risiko mit der Leukozytenzahl (Lowe et al 1985) und die Mortalität in den ersten zwei Monaten nach Infarkt ist vierfach erhöht, wenn die Leukozytenzahl 15000/ μ l übersteigt (Cole et al 1954).

Alle diese Daten belegen, daß Entzündungsvorgänge eine entscheidende Bedeutung bei der Pathogenese der koronaren Herzerkrankung und des Myokardinfarktes haben. Es ist daher von großem therapeutischem und prognostischem Nutzen, die zugrundeliegenden Mechanismen, die zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren führen, zu klären.

Alle Entwicklungsstadien der arteriosklerotischen Plaques sind durch eine Ansammlung von immunkompetenten Zellen, d.h. Monozyten und Lymphozyten gekennzeichnet (Ross et al 1986, Munro et al 1988, Ross et al 1993, Libby et al 1991). Immunchemisch konnte gezeigt werden, daß es bereits vor der Bildung der Lipidplaques zu einer Ansammlung von Blutmonozyten in der Gefäßwandintima kommt (Gerrity 1981). Diese vermehrte Adhärenz von Monozyten an das Endothel wird unter anderem durch erhöhte LDL-Plasmaspiegel induziert, da oxidiertes LDL gemäß der "response-to-injury"-Hypothese zu einer proinflammatorischen Veränderung des Gefäßendothels führt (Ross et al 1986, Ross et al 1993). Oxidiertes LDL wirkt chemotaktisch auf Monozyten und unterstützt die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen (Khan et al 1994). Es kommt zur Adhäsion und subendothelialen Migration von Monozyten, die durch die Aufnahme von oxLDL zu Schaumzellen werden (Gerrity et al 1981, Ross et al 1993). In der Plaque kommt es zur Sekretion verschiedener Wachstumsfaktoren wie PDGF und TGF β und Zytokine wie IL-1, IL-6 und IL-8 sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen im Sinne einer entzündlichen Veränderung des Gewebes (Ross et al 1999). Anhand von immunzytochemischen Untersuchungen von rupturierten Plaques, die zum akuten

Myokardinfarkt führten, konnte ein Zellinfiltrat wie bei einer akuten Entzündungsreaktion nachgewiesen werden (Van der Wal et al 1994).

Die Entzündungsvorgänge, die während eines akuten Myokardinfarkts ablaufen, sind zu Beginn durch einwandernde Leukozyten charakterisiert. Die Leukozyten repräsentieren den ersten Schritt eines Heilungsprozesses, in dem nekrotisches Myokard durch fibrotisches Narbengewebe ersetzt wird. Durch die Demarkation des Nekrosegebietes und die Initiation des Heilungsprozesses kommt den Leukozyten eine wichtige Rolle bei der Reparatur zu (Mallory et al 1939). Allerdings führt eine Inhibierung der Migration und Aktivierung von Leukozyten zu einer Verminderung der Infarktgröße (Mullane et al 1983, Romson et al 1983, Bohle et al 1991). Die akute postischämische Entzündungsreaktion trägt durch die Freisetzung von zytotoxischen Mediatoren zu einer weiteren Schädigung des Myokards bei (Entman et al 1991). Vor allem nach Reperfusion wirken die Komplementaktivierung durch Zellbestandteile und die Produktion von Leukotrienen und Sauerstoffradikalen durch aktivierte Leukozyten chemotaktisch und locken weitere Leukozyten in das Infarktgebiet (Engler et al 1986). Bei dieser sog. "reperfusion injury" kommt es zu einer Interaktion zwischen Endothelzellen und Leukozyten und dadurch zu einer vasomotorischen Dysfunktion des Endothels, die zu einer vollständigen Gefäßobstruktion führen kann (Kloner et al 1993, Entman et al 1994). Eine weitere Folge des "reperfusion injury" ist das sogenannte "Myocardial stunning", das von Braunwald et al (1982) als eine postischämische ventrikuläre Dysfunktion beschrieben wurde. Dabei kommt es trotz Reperfusion zu einem vorübergehenden Verlust an Kontraktilität nicht irreversibel geschädigter Myozyten (Hearse et al 1992, Kloner et al 1993). Monozyten sind bedeutende Effektorzellen bei akuten Entzündungsvorgängen (Johnston et al 1988). Im Gegensatz zu Neutrophilen, die nach einigen Stunden funktionsuntüchtig werden, wandern Monozyten über mindestens weitere 24 Stunden in das Gewebe und werden dann zu langlebigen Gewebsmakrophagen (Issekutz et al 1981). Das bedeutet, daß Monozyten nicht nur während der Migration mit der Gefäßwand Kontakt aufnehmen, sondern auch während ihrer

Präsenz im subendothelialen Gewebe. Monozyten haben zum einen prokoagulatorische Aktivität (Harlan et al 1987), vor allem aber setzen sie im stimulierten Zustand proinflammatorische Zytokine wie TNF α und IL-1 frei (Dinarello et al 1992).

1.2 Zytokine in der Arteriosklerose und im akuten Myokardinfarkt

Zytokine sind Glykoproteine von 8-80 kDa Größe, die eine regulierende Wirkung in der Kontrolle des Wachstums und der Differenzierung von Zellen haben. Als Botenstoffe sind sie insbesondere bei der Blutbildung und bei der Aktivierung und Steuerung des Abwehrsystems von Bedeutung. Sie werden entweder sezerniert oder an der Zelloberfläche exprimiert und binden an für sie spezifische Rezeptoren auf den Zielzellen. Die Zielzelle kann dabei entweder die sezernierende Zelle selbst (autokrine Wirkung der Zytokine) oder aber eine benachbarte oder sogar weiter entfernte Zelle sein (parakrine bzw. endokrine Wirkung) (Dinarello et al 1987). Die Wirkung der Zytokine auf ihre Zielzellen ist in erster Linie von der Umgebung bestimmt, in welcher sie wirken; so können verschieden Zytokine auf dieselbe Zelle einen inhibitorischen, synergistischen oder additiven Effekt haben (Pober et al 1990). Letztlich resultiert aus der Vielzahl von Informationen und Einflüssen eine sehr präzise Antwort des Organismus auf einen Reiz.

In der Arteriosklerose und im akuten Myokardinfarkt spielen Zytokine eine wichtige Rolle bei der Regulation der postischämischen Entzündung. Sowohl die Zellen der Gefäßwand, d.h. Endothelzellen und glatte Muskelzellen als auch Leukozyten sind in der Lage, verschiedene Mediatoren der Entzündungsantwort zu synthetisieren und damit die zellulären Reaktionen zu regulieren.

Interleukin-6 ist ein multifunktionelles Zytokin mit pro- und antiinflammatorischen Eigenschaften. Seine Hauptfunktionen sind die Induktion der Reifung und Differenzierung von Lymphozyten (Kishimoto et al 1989), die wachstumsfördernde Wirkung auf hämatopoetische Stammzellen (Ikebuchi et al

1987, Ishibashi et al 1989) und Plasmozytom- und Hybridomazellen (van Damme et al 1987) sowie die Induktion der Synthese von Akut Phase-Proteinen in der Leber (Kishimoto 1989, Le et al 1989). Die Akut Phase-Reaktion ist charakterisiert durch eine Leukozytose, Fieber, eine erhöhte Gefäßpermeabilität, eine erhöhte Steroidkonzentration im Plasma und durch erhebliche Konzentrationsänderungen verschiedener Plasmaproteine mit dem CRP als Hauptvertreter der Akut-Phase-Proteine. Damit soll die durch eine Noxe aus dem Gleichgewicht gebrachte Homeostase wiederhergestellt werden (Heinrich et al 1990). Mit der hepatischen Induktion von CRP, Fibrinogen und anderen Akut-Phase-Proteinen kommt IL-6 eine zentrale Bedeutung bei der Regulation von Entzündungsvorgängen zu (Akira et al 1990).

Im akuten Myokardinfarkt kommt es zu einem systemischen Anstieg von IL-6 im Plasma (Ikeda et al 1992, Sturk et al 1992, Miyao et al 1993). Seino et al (1995) konnte zudem nachweisen, daß Infarktpatienten, die nach Reperfusion ein sog. "Myocardial stunning" entwickelten, höhere Plasmawerte an IL-6 aufwiesen als Patienten ohne passagere ventrikuläre Dysfunktion.

Auch in der instabilen Angina pectoris sind die Plasmawerte für IL-6 erhöht und korrelieren mit dem CRP (Biasucci et al 1996, Berk et al 1990), so daß man dem IL-6 eine prognostische Bedeutung für den Verlauf der instabilen Angina und des akuten Infarkts zusprechen kann.

Neumann et al (1995) konnte an Infarktpatienten, bei denen durch PTCA eine Reperfusion erzielt wurde, zeigen, daß es im Myokard selbst zu einer Freisetzung von IL-6 und IL-8 kommt. Die lokale IL-6 Freisetzung fördert die Ausschüttung freier Radikale in Neutrophilen (Kharazmi et al 1989), stimuliert die ICAM-1 Expression auf kardialen Myozyten (Kukielka et al 1995), erhöht die Gefäßpermeabilität (Maruo et al 1992) und induziert eine prokoagulatorische Aktivität in Monozyten (Neumann et al 1997). Ob jedoch Entzündungszellen oder Gewebszellen des Myokards für die IL-6 Freisetzung verantwortlich sind, ist noch ungeklärt. Prinzipiell sind vor allem Monozyten/Makrophagen, Endothelzellen und Fibroblasten in der Lage, IL-6 freizusetzen (Tamm 1989). In der arteriosklerotischen Plaque konnte im Vergleich zur normalen Gefäßwand eine

vermehrte Expression der mRNA für IL-6 (Ikeda et al 1992, Szekanecz 1994, Rus et al 1996) und IL-8 (Rus et al 1996) nachgewiesen werden. Beide Zytokine stimulieren das Wachstum glatter Muskelzellen (Rus et al 1996) und fördern somit das Fortschreiten des arteriosklerotischen Prozesses.

Interleukin-1 ist ein proinflammatorisches Zytokin, das vor allem auto- und parakrin wirksam ist und die Expression anderer Zytokine induziert. Dabei entfaltet IL-1 seine Wirkung auf die Zielzelle über spezifische Oberflächenrezeptoren und verändert die Zellantwort durch Induktion oder Suppression verschiedener Gene (Dinarello 1992). Unterschiedliche Reize wie bakterielle Endotoxine, Immunkomplexe und Komplementfaktoren stimulieren die IL-1 Freisetzung, wobei in erster Linie Monozyten und Gewebsmakrophagen für die Produktion verantwortlich sind (Durum et al 1985). Die Hauptwirkungen von IL-1 sind die Stimulation von T-Helferzellen und B-Lymphozyten, eine Steigerung des Arachidonsäure-Metabolismus in den am Entzündungsvorgang beteiligten Zellen ebenso wie eine fiebererzeugende Wirkung im Hypothalamus (Durum et al 1985, Dinarello et al 1992). Im Endothel induziert IL-1 eine prokoagulatorische Aktivität (Bevilacqua et al 1985), die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ELAM, ICAM und VCAM, die Synthese von chemotaktischen Faktoren (Harlan et al 1987, Pober et al 1990, Sica et al 1990) und in Endothelzellen und Monozyten die Freisetzung von IL-6 (Sironi et al 1989, Tosato et al 1990). IL-6 hingegen hat keinen derartigen Effekt auf die Endothelzellen (Sironi et al 1989).

TNF α ist ein weiteres Zytokin, welches ebenfalls vor allem von Monozyten/Makrophagen sezerniert wird und in seiner proinflammatorischen Wirkung dem IL-1 sehr ähnlich ist (Le et al 1987). TNF α kann in Endothelzellen die IL-1 Produktion induzieren (Libby et al 1986). Unter Einwirkung von IL-1 und TNF α kommt es zu einer verstärkten Adhäsion von Neutrophilen und Monozyten an das Endothel durch die Induktion der Expression von Adhäsionsmolekülen (Bevilacqua et al 1985, Pober et al 1986). Beide Zytokine stimulieren die endotheliale Produktion von Leukozyten-aktivierenden Faktoren wie MCP-1 und IL-8 (Sica et al 1990).

IFN γ ist ein immunmodulatorisches Zytokin. Aktivierte Makrophagen präsentieren über MHC II-Moleküle den T-Lymphozyten Antigene. Die T-Lymphozyten werden aktiviert und sezernieren IFN γ in großen Mengen (Ross et al 1993, Szekanecz et al 1994, Ross et al 1999). IFN γ wirkt unter anderem als Makrophagen-aktivierender Faktor (Pober et al 1990) und hat verschiedene Einflüsse auf Endothelzellen wie die Induktion von ICAM-1 und die Expression von MHC Klasse II Antigenen (Dustin et al 1986, Pober et al 1986). Im Gegensatz zu IL-1 und TNF α ist IFN γ nicht in der Lage, die Synthese von IL-6 (Leeuwenberg et al 1990), IL-1 (Pober et al 1990) oder IL-8 (Lukacs et al 1995) zu induzieren. Die Morphologie der Endothelzellen verändert sich unter Einwirkung von IFN γ , es kommt zu einer Reorganisation des Zytoskeletts und damit zu einer veränderten Zellform. In arteriosklerotischen Plaques kann IFN γ als ein Produkt aktivierter T-Lymphozyten nachgewiesen werden (Libby et al 1991). IFN γ ist sowohl ein Helfer der Lymphozyten vermittelten Entzündung als auch akuter Entzündungsvorgänge.

	Endothelzellen	Glatte Muskelzellen	Monozyten/ Makrophagen	T-Lymphozyten
IL-1	+	+	+	-
TNFα	-	+	+	+
IL-2	-	-	-	+
IL-6	+	+	+	
IL-8	+		+	-
MCP-1	+	+	+	
IFNγ	-	-	-	+

Tab.1: Zytokinexpression in verschiedenen Zellen

1.3 Die Interaktion von Leukozyten und Endothelzellen

Um in ein Gewebe zu gelangen, müssen Leukozyten das Endothel passieren. Im Entzündungsgebiet kommt es zu vermehrtem Kontakt von Leukozyten mit dem Endothel. Sowohl Endothelzellen als auch Leukozyten exprimieren an ihrer Oberfläche Rezeptoren, um miteinander zu interagieren (Harlan 1985). Das Endothel fungiert dabei als Barriere, da es zum einen konstitutiv, zum anderen durch den Einfluß von Entzündungsmediatoren verschiedene Adhäsionsmoleküle exprimiert und dadurch darüber entscheidet, welche Subpopulation von Leukozyten wann und zu welchem Zeitpunkt aus dem Blutstrom in das Gewebe einwandert (Osborn 1990).

Selektin-Moleküle auf Endothelzellen sind verantwortlich für die erste Adhäsion von im Blut zirkulierenden Leukozyten mit der Gefäßwand. In einem zweiten Schritt werden Leukozyten durch verschiedene Chemokine, die zum Teil von Endothelzellen freigesetzt werden, aktiviert. Durch die unterschiedliche Verteilung von Chemokinrezeptoren auf Monozyten und Neutrophilen kann je nach exprimiertem Chemokin eine andere Zellverteilung im Gewebe erreicht werden. Eine stabile Bindung zwischen Endothel und Leukozyten erfolgt durch die aktivierungsabhängige Expression von Integrinen auf Leukozyten (Butcher 1991). Jedes Integrin besteht aus einer nicht-kovalent verbundenen α - und β -Untereinheit, von denen es mehrere Untergruppen gibt (Hynes 1992). Die Aktivierung durch Chemokine ist notwendig, um die Affinität von Integrinen für ihre Liganden auf Endothelzellen, den Ig Superfamilie-Mitgliedern, zu erhöhen und eine stabile Adhäsion zu erreichen (Springer 1995). Ein Charakteristikum für Integrine ist, daß sie nicht nur Vermittler der Adhäsion sind, sondern aktiv Signale in die Zelle transduzieren und auf bestimmte Signale mit einer Konformationsänderung ihres Rezeptors antworten, um stabile Bindungen eingehen zu können. Vor allen Dingen die zytoplasmatische Domäne der β -Untereinheit, die mit dem Zytoskelett der Zelle verbunden ist, fungiert als Regulationsinstrument, mit dem nach Art des inside-out signaling eine höhere

Affinität des Rezeptors erreicht werden kann (Hynes 1992). Auf der anderen Seite kommt den Integrinen eine wichtige Funktion bei der Signaltransduktion zu (outside-in signaling). Die für die Rekrutierung von Neutrophilen und Monozyten wichtigsten Mitglieder der Ig-Superfamilie sind ICAM-1, ICAM-2 und VCAM-1 auf Endothelzellen, wobei die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 durch Entzündungsmediatoren wie IL-1 und TNF- α stimuliert wird (Pober et al 1986, Mantovani et al 1992).

Name	Integrin Nomenklatur	CD Nomenklatur	Exprimiert durch	Gegenrezeptor auf Endothelzellen
LFA-1	α L β ₂	CD11a/CD18	Alle Leukozyten	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3
Mac-1	α M β ₂	CD11b/CD18	Neutrophile, Monozyten, Eosinophile	ICAM-1, Fibrinogen
p150, 95	α X β ₂	CD11c/CD18	Neutrophile, Monozyten, Eosinophile	Fibrinogen
VLA-4	α ₄ β ₁	CD49d/CD29	Monozyten, Lymphozyten, Eosinophile	VCAM-1, Fibronectin

Tab.2: Die Familie der Integrine auf Leukozyten (Springer 1994)

Verschiedene Zelladhäsionsmoleküle spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Arteriosklerose und des akuten Myokardinfarkts (Jang et al 1994). In atheromatösen Plaques werden vermehrt ICAM-1 (Poston et al 1992)

und VCAM-1 (O'Brien et al 1993, Davies et al 1993) von Endothelzellen und glatten Muskelzellen exprimiert. Wie Gerrity (1981) und Ross (1986) zeigen konnten, ist die Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen einer der ersten Schritten in der Entwicklung der Arteriosklerose. VCAM-1 vermittelt die Adhäsion von Monozyten und T-Lymphozyten (Springer 1990, Carlos et al 1990), die den Hauptbestandteil an Entzündungszellen in den atheromatösen Plaques ausmachen (Ross et al 1986). Neutrophile besitzen keinen Gegenrezeptor für VCAM-1 (Hemler et al 1990, Springer et al 1990). VCAM-1 wird vermehrt dort in atherosklerotischen Plaques gefunden, wo das entzündliche Zellinfiltrat am dichtesten ist (O'Brien et al 1993). Die Konzentration an löslichem VCAM-1 im Blut korreliert mit dem Ausmaß der Arteriosklerose (Peter et al 1997).

VCAM-1 wird von unstimuliertem Endothel basal exprimiert. Nach Stimulierung mit IL-1 und TNF α kommt es nach 4-6 Stunden zur Induktion von VCAM-1 mit einem Maximum nach 12-18 Stunden. Über die nächsten 72 Stunden bleibt VCAM-1 hochreguliert (Osborn et al 1989, Fries et al 1993). Diese Kinetik impliziert, daß VCAM-1 sowohl bei der akuten als auch bei der chronischen Entzündung eine Rolle spielt und in erster Linie immunkompetente Zellen und Monozyten zum Ort der Entzündung bringt (Osborn et al 1989). So konnte eine verstärkte VCAM-1 Expression in chronisch entzündetem Gewebe und während der Abstoßung von Herztransplantaten nachgewiesen werden (Rice et al 1991). Das Integrin VLA-4 besteht aus einer β 1-Untereinheit und einer damit nicht-kovalent verbundenen α 4-Untereinheit (Hynes 1992, Elices 1990). Es wird in hohem Maße von T- und B-Lymphozyten und Monozyten exprimiert (Hemler 1990) und ist in der Lage, sowohl Zell-Zell-Kontakte über VCAM-1 einzugehen als auch an Matrixkomponenten wie Laminin, Fibronectin und Kollagen zu binden (Hemler 1990, Springer 1990).

Im ischämischen Myokard wird nach Reperfusion vermehrt ICAM-1 auf der Zelloberfläche von Endothelzellen und Myozyten exprimiert (Kukielka et al 1993). Die postischämische kardiale Lymphflüssigkeit enthält sowohl leukotaktische Faktoren als auch Zytokine, die Leukozyten aktivieren und ICAM-1 induzieren. Die aktivierten Leukozyten tragen an ihrer Oberfläche vermehrt

CD11b/CD18 und sind vor allem dort im reperfundierten Myokard anzutreffen, wo verstärkt ICAM-1 exprimiert wird (Kukielka et al 1993). Tierexperimentelle Untersuchungen haben gezeigt, daß in ischämischem bzw. reperfundiertem Myokard die Infarktgröße reduziert und die Leukozytenakkumulation verringert werden kann, wenn Leukozyten durch einen monoklonalen Antikörper gegen das Integrin CD11/CD18 blockiert werden (Simpson et al 1990, Ma et al 1991) oder wenn ICAM-1 inhibiert wird (Yamazaki et al 1993).

1.4 NF- κ B und Entzündungsvorgänge im akuten Myokardinfarkt

NF- κ B ist der Prototyp einer Familie von dimeren Transkriptionsfaktoren, der sogenannten Rel Familie. Diese Transkriptionsfaktoren regulieren die Expression zahlreicher Gene z.B. in Zellen des Immunsystems (Baeuerle et al 1994, Thanos et al 1995). 1986 konnten Sen und Baltimore als erste NF- κ B als einen Faktor identifizieren, der während der Entwicklung von B-Lymphozyten die Produktion der κ -Leichtketten von Immunglobulinen aktiviert. Man stellte fest, daß NF- κ B auch im Zytoplasma anderer Zellen vorhanden ist (Lenardo et al 1989). NF- κ B liegt komplexgebunden mit seinem Inhibitor I κ B im Zytoplasma und bildet so eine inaktive Form (Baeuerle et al 1988, Lenardo et al 1989). Durch unterschiedliche Einflüsse, zum Beispiel durch proinflammatorische Zytokine, Viren und bakterielle Zellbestandteile kommt es zu einer Aktivierung von Proteinkinasen und zur Phosphorylierung von I κ B (Baeuerle 1991, Grilli et al 1993). Das hat eine Dissoziation des NF- κ B/I κ B-Komplexes und die Translokation von NF- κ B zum Zellkern zur Folge (Gosh et al 1990). NF κ B bindet im Zellkern direkt an die Promoterregion des Gens, dessen Transkription induziert werden soll (Baeuerle 1991, Grilli et al 1993). Mit dem NF- κ B/I κ B-Komplex hat die Zelle ein sehr schnelles Reaktionssystem, da NF- κ B nach Eintreffen eines Signals nicht erst neu synthetisiert werden muß. Am häufigsten besteht NF- κ B aus den beiden DNA-bindenden Untereinheiten p50 und p65. p50 ist in erster Linie für die Bindung an die DNA verantwortlich, wohingegen p65 für die

Bindung an I κ B im Zytoplasma und die Aktivierung der Transkription zuständig ist (Baeuerle 1991, Thanos et al 1995).

Um ein bestimmtes Gen zu aktivieren, sind zusätzliche Transkriptionsfaktoren oder regulierende DNA-Sequenzen in der Nähe der NF- κ B Bindungsstelle erforderlich (Lenardo et al 1989). Die Spezifität der Transkriptionsaktivierung wird zusätzlich durch die Kombination verschiedener NF- κ B-Untereinheiten, leicht abgewandelte NF- κ B-Regulationselemente sowie die Architektur der Promoterregionen reguliert (Baeuerle 1991).

NF- κ B spielt eine wichtige Rolle bei der Genexpression von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen. Die schnelle Induktion von IL-1, IL-6, IL-8 und MCP-1 (Libermann et al 1990, Baeuerle et al 1994) sowie die Hochregulation von ELAM-1, VCAM-1 und ICAM-1 (Baeuerle et al 1991, Collins et al 1995, Thanos et al 1995) machen NF- κ B zu einem zentralen Regulator in der entzündungsvermittelten Myokardschädigung nach Ischämie und Reperfusion. Eine Aktivierung von NF- κ B kann bereits durch verminderte Sauerstoffkonzentrationen erreicht werden, wie es für die Ischämie typisch ist (Baldwin et al 1996). Die Relevanz von NF- κ B bei der Entwicklung eines Myokardinfarktes konnte durch in vivo-Versuche an Rattenherzen dargelegt werden. Dabei konnte durch Transfektion von doppelsträngigen "decoy" Oligodeoxynukleotiden, die aktiviertes NF- κ B binden, das Ausmaß des Myokardschadens während der frühen Reperfusion erheblich reduziert werden (Morishita et al 1997). Das NF- κ B System ist möglicherweise entscheidend an der Initiation von arteriosklerotischen Gefäßläsionen beteiligt, wofür vor allem oxidative Vorgänge verantwortlich gemacht werden (Ross 1986, Munro et al 1988). Freie Sauerstoffradikale und oxidiertes LDL sind in der Lage, NF- κ B zu aktivieren (Collins et al 1993, Baeuerle et al 1994, Brand et al 1997). Brand et al (1996) konnten in arteriosklerotischem Gewebe aktiviertes NF- κ B in Makrophagen, glatten Muskelzellen und Endothelzellen nachweisen. In arteriosklerotischen Läsionen kommt es zur vermehrten Expression von NF- κ B

regulierten Genen wie IL-1 β , TNF α , MCP-1 und Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1 (Cybulsky et al 1991, Collins 1993, Ross 1993, Baeuerle et al 1994).

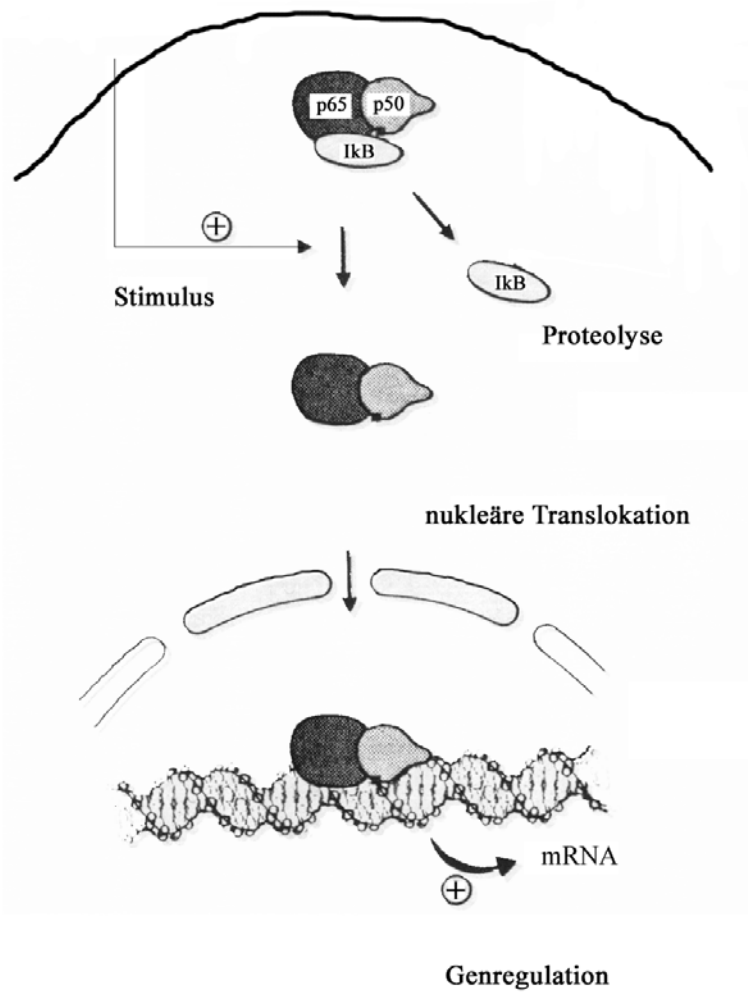


Abb.1: Die Aktivierung von NF- κ B

(Baeuerle, *Biochimica et Biophysica Acta* 1991, p.67)

Eine Stimulierung der Zelle führt zur Dissoziation des NF κ B/I κ B-Komplexes und zur Proteolyse von I κ B. Der aktivierte NF κ B-Komplex tritt in den Zellkern über und bindet an regulatorische κ B-Promotor- und Enhancer-Elemente verschiedener Gene.

1.5 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob es in Endothelzellen nach Inkubation mit Infarktplasmen oder mit mononukleären Zellen zu einer Expression von IL-6 und IL-1 β kommt.

Ausgangspunkt dieser Arbeit waren dabei folgende Ergebnisse:

Im akuten Myokardinfarkt kommt es zur Freisetzung von Interleukin-6 und zur Neutrophilenaktivierung (Neumann et al 1995).

Die Inkubation von Leukozyten mit aktivierten Thrombozyten führt zur Freisetzung von IL-1 β in Leukozyten (Neumann et al 1997).

Die Inkubation von Leukozyten mit Infarktplasma führt zur Freisetzung von IL-1 β und IL-8 (Marx et al 1997).

Endothelzellen exprimieren Interleukin-1 β abhängig Interleukin-6 (Sironi et al 1989).

Da prinzipiell beide Zellarten in der Lage sind, sowohl IL-1 β als auch IL-6 zu produzieren (Le et al 1989, Pober et al 1990), galt es in einem zweiten Schritt nachzuweisen, ob und welcher der beiden Zelltypen Hauptproduzenten für eines der beiden Interleukine sind. Mit Hilfe eines IL-1-Rezeptorantagonisten sollte gezeigt werden, ob die IL-6 Freisetzung IL-1 β abhängig erfolgt.

Ziel des zweiten Teils der Arbeit war die Charakterisierung der Beteiligung von Adhäsionsmolekülen an der Endothelzell-Monozyten-Interaktion.

Zum dritten sollte untersucht werden, ob es durch Adhäsion von Monozyten an aktiviertes Endothel zu eine NF- κ B Aktivierung kommt. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B spielt eine große Rolle bei der Induktion von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen (Baeuerle et al 1994, Collins et al 1995).

2 Material und Methoden

Alle Chemikalien wurden in der Qualität “pro analysis” verwendet.

2.1 Endotoxintest

Um eine Kontamination mit Endotoxin zu vermeiden wurde jede kristalline Lösung ultrafiltriert (U2000TM, Fa.Gambro) und jede Proteinlösung wurde durch Polymyxin-Säulen (Fa.Pierce) gereinigt. Ebenso wurden alle verwendeten Lösungen und Zellansätze vor und nach jedem Versuch mittels ‘Limulus amoebocyte lysate (L.A.L.)’-Test (Fa.Schulz) überprüft. Die Nachweisgrenze des ‘L.A.L.-Test’ für Endotoxin lag bei 0,125 U/ml.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Zellkulturmaterialien

Endothelial Cell Growth Medium

PromoCell (Heidelberg)

(enthält 10 ml FKS, 2 ml Endothelial Cell Growth Supplement/Heparin, 0,05 µg/500 µl humanen rekombinanten Endothelial Cell Growth Factor, 0,5 µg / 500 µl humanen rekombinanten Fibroblast Growth Factor, 500 µg / 500 µl Hydrocortison, 25 mg / 250 µl Gentamicin, 1,25 mg / 250 µl Amphotericin B)

Medium 199

Sigma (München)

Trypsin/EDTA-Lösung

Biochrom (Berlin)

(0,05% Trypsin, 0,02% EDTA)

<u>FKS (mykoplasmenfreies fetales Kälberserum)</u>	<i>Bio Whittaker (Heidelberg)</i>
<u>Glutamin</u>	<i>Gibco (Karlsruhe)</i>
<u>Penicillin G (100 U/ml) /Streptomycin (100 mg/l)</u>	<i>Bio Whittaker (Heidelberg)</i>
<u>IFN-γ</u>	<i>Tebu (Frankfurt am Main)</i>
<u>TNF-α</u>	<i>Sigma (München)</i>
<u>IL-1β</u>	<i>Sigma (München)</i>
<u>Rh-IL-6</u>	<i>DPC Biermann(Bad Nauheim)</i>

2.2.2 Antikörper

<u>Anti-ICAM-1-Antikörper, Klon 84H10</u>	<i>Immunotech (Hamburg)</i>
<u>Anti-VCAM-1-Antikörper, Klon BBJG-V1</u>	<i>R&D-Systems (Wiesbaden)</i>
<u>Anti-E-Selektin-Antikörper, Klon 1.2B6</u>	<i>Immunotech (Hamburg)</i>
<u>Anti-L-Selektin-Antikörper, Klon Dreg 56</u>	<i>Immunotech (Hamburg)</i>
<u>Anti-P-Selektin-Antikörper, Klon G1</u>	<i>Immunotech (Hamburg)</i>
<u>Anti-α4-Integrin-Antikörper, Klon 2B4</u>	<i>R&D-Systems (Wiesbaden)</i>
<u>Anti-β1-Integrin-Antikörper, Klon Lia1/2</u>	<i>Immunotech (Hamburg)</i>
<u>FITC-konjugierter anti-VCAM-1-Antikörper</u>	<i>Immunotech (Hamburg)</i>
<u>IL-1 Rezeptorantagonist</u>	<i>Sigma (München)</i>
<u>IL-6-Antikörper</u>	<i>DPC Biermann(Bad Nauheim)</i>

2.2.3 Permanente Zelllinien

HUVEC: Endothelzellen aus der menschlichen Nabelschnurvene. Mittels Collagenase (Worthington Biochemical Corp., Freehold, New Jersey, USA) wurden die Endothelzellen aus der Nabelschnur geerntet (Jaffe et al 1973), in Endothelial Cell Growth Medium aufgenommen und weiterkultiviert.

ECV: immortale menschliche endothel-ähnliche Zelllinie (American Tissue Culture Collection, ATCC, Rockville, Maryland, USA). Die

Zellen wurden in Medium M 199 mit 10% FKS, 2 mmol/l Glutamin, Penicillin G, Streptomycin kultiviert.

Kulturbedingungen:

Die Zellen wurden bei 37°C in wassergesättigter Luft mit 5% CO₂ kultiviert. Zur Weiterkultivierung der Endothelzellen wurden konfluente Platten mit PBS (Gibco) gewaschen, die Zellen dann mit Trypsin/EDTA von der Platte gelöst, in neuem Medium aufgenommen, zentrifugiert und das Zellpellet dann in einer Verdünnung von 1/10 bis 1/40 in Kulturmedium resuspendiert.

Die HUVEC wurden nach ein bis zwei Passagen, die ECV als immortale Zelllinie je nach Bedarf auf six-well Platten bzw. Petrischalen (Nunc, Wiesbaden) für einen Versuch ausgelegt.

2.3 Isolation von mononukleären Zellen

Zur Präparation von mononukleären Zellen wurde gesunden Probanden Blut abgenommen, wobei das Blut mit 1:10 (vol/vol) CPDA (Fa.Greiner) ungerinnbar gemacht wurde. Anschließend wurden je 25 ml Ficoll-Paque Research Grade (Pharmacia Biotech, Freiburg) mit 25 ml CPDA-Blut vorsichtig überschichtet und der Gradient bei 900 g 17 min ohne Bremse zentrifugiert. Durch die unterschiedliche Dichte kommt es zur Ausbildung von Zellschichten, wobei sich die Erythrozyten und Granulozyten nach unten absetzen und die mononukleären Zellen und Thrombozyten in der Interphase zwischen Plasma und Ficoll zu finden sind. Diese Interphase wurde mit einer Transferpipette abgenommen und die Zellen anschließend dreimal mit PBS gewaschen, um sie von Thrombozyten, Plasma- und Ficoll-Paque-Resten zu befreien.

Die Anzahl der gewonnenen Zellen wurde in einem Zellcounter, Sysmex F-800, bestimmt.

Die Kontamination mit Neutrophilen war stets unter 5%.

2.4 Isolation von Monozyten

Bei der Gewinnung von Monozyten werden die durch den Ficollgradienten gewonnenen mononukleären Zellen auf einen zweiten Dichtegradienten mit Percoll (Pharmacia Biotech) überschichtet. Der Percoll-Gradient wurde vorher pro Röhrchen aus 15 ml Percoll-Lösung, 13,5 ml Spinner-Lösung (500 ml S-MEM Eagle with Earle's salts, 5 ml Glutamin, 5 ml Penicillin/Streptomycin, 30 mM NaHCO₃) und 1,5 ml 10× steril filtriertem PBS hergestellt und bei 10000 g 10 min ohne Bremse präformiert. Anschließend wurden die in Spinner-Lösung aufgenommenen mononukleären Zellen mit einer Transferpipette über den Gradienten geschichtet und bei 400 g 40 min ohne Bremse zentrifugiert. Der oberste, kaum sichtbare Ring enthielt die Monozyten. Dieser wurde mit einer Eppendorfpipette vorsichtig abgenommen, in ein Falcon-Röhrchen überführt, mit Spinner-Lösung einmal gewaschen und schließlich im Zellcounter gemessen. Die Reinheit an Monozyten betrug stets über 85%.

2.5 Inkubation von Endothelzellen mit mononukleären Zellen bzw. Monozyten

Für die Kokultivierungsversuche wurden die Endothelzellen auf 6-well-Platten (Durchmesser: 35 mm) (Nunc) ausgelegt und im Brutschrank bis zu einer Zelldichte von 5×10^5 gezogen. Um voraktivierte Endothelzellen zu erhalten, wurde ein Teil der konfluenten Endothelzellmonolayer mit menschlichem rekombinantem IFN γ bzw. TNF α in einer Konzentration von 10^6 U/l für 16 Stunden vorinkubiert. Vor der Kokultivierung wurde IFN γ bzw. TNF α durch dreimaliges Waschen der vorinkubierten Zellen mit Zellmedium entfernt. Nichtvorinkubierte Endothelzellen wurden vor der Kokultivierung dreimal mit Zellmedium gewaschen, um tote Zellen und Zellreste zu entfernen. Je nach Versuchsaufbau wurden 1×10^6 bis 5×10^5 Monozyten bzw. mononukleäre Zellen pro ml Zellmedium aufgenommen, wobei das Zellmedium vorher mit CaCl₂ in

einer Konzentration von 1 mmol/l und Polymyxin in einer Konzentration von 10 g/l versetzt wurde. CaCl_2 wird zur Zellbindung benötigt und Polymyxin soll Spuren von LPS binden. 1 well mit Endothelzellen wurde mit 1 ml der Zellsuspension inkubiert.

Diese Grundprinzip der Kokultivierung wurde je nach Experiment modifiziert.

In einer Versuchsreihe wurde die Kokultivierung unter Zusatz von Antikörpern gegen Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen durchgeführt. Dafür wurden die Endothelzellen für 1 Stunde mit den Antikörpern bei 37°C im Brutschrank vorinkubiert. Im Versuch wurden gegen Endothelzellrezeptoren anti-VCAM-1-, anti-ICAM-1- und anti-E-Selektin-Antikörper in einer Konzentration von 5 µg/ml bzw. anti-P-Selektin-Antikörper in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt. Nach der Vorinkubation wurden die Endothelzellen dreimal mit Medium gewaschen und dann mit den Monozyten inkubiert.

In einer zweiten Versuchsanordnung wurden die Monozyten mit Antikörpern gegen $\alpha 4$ -Integrin, $\beta 1$ -Integrin oder L-Selektin in einer Konzentration von 5 µg/ml für 1 Stunde vorinkubiert, dreimal mit Medium gewaschen und schließlich auf die Endothelzellen gegeben.

Der IL-1-RA wurde in einem dritten Versuchstyp in einer Konzentration von 10 ng/ml zusammen mit den Monozyten auf die Endothelzellen gegeben.

Einige Versuche wurden mit sogenannten transwells, Plastikeinsätze mit Poren, die eine direkte Adhäsion der beiden Zellarten verhindern, durchgeführt (Porengröße 0,4 µm) (Fa.Costar, Wiesbaden). Dabei wurden die transwells auf die Endothelzellen gesetzt und direkt auf die Membran die Monozyten gegeben. Als Kontrolle aller Kokultivierungsversuche dienten Endothelzellen und Monozyten bzw. mononukleäre Zellen alleine, wobei die Endothelzellen sowohl unstimuliert und mit IFN γ oder TNF α vorstimuliert als auch als Positivkontrolle mit IL-1 β stimuliert verwendet wurden. Nach 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C wurden die Überstände abgenommen und dann bei 550 g 10 min bei 4°C zentrifugiert, um mitabgenommene Zellen zu eliminieren.

2.6 Inkubation von Endothelzellen mit Infarktplasmen

HUVEC-Monolayer in 6-well-Platten wurden mit 500 μ l Patientenplasma und 500 μ l Zellmedium inkubiert. In einem zweiten Ansatz wurde dem Patientenplasma der IL-1 RA zugesetzt. Nach 24 stündiger Inkubation wurde der Überstand abgenommen und in den ELISA eingesetzt.

Insgesamt wurde das Plasma von 45 Patienten verwendet. 30 der Patienten hatten einen akuten Myokardinfarkt erlitten und waren durch PTCA mit Stentimplantation behandelt worden. Als Kontrollgruppe dienten 15 Patienten mit elektiver PTCA bei symptomatischer koronarer Herzerkrankung. Ausschlußkriterien waren chronische Entzündungen, Infekte und Neoplasien. Keiner der Patienten nahm entzündungshemmende Medikamente außer Aspirin in einer Dosis von 100 mg/d. In beiden Gruppen erfolgte die Stentimplantation nach dem gleichen Schema und die Rekanalisation der betroffenen Arterie konnte mit Erfolg durchgeführt werden. 24-48 Stunden postinterventionell wurde peripher venöses Blut abgenommen und 1:10 (vol/vol) mit CPDA verdünnt.

2.7 Durchflußzytometrie

Die Expression von VCAM-1 auf Endothelzellen wurde mittels Durchflußzytometrie untersucht. Dafür wurden die adhärennten Endothelzellen mechanisch abgelöst, dreimal mit PBS gewaschen und resuspendiert. 40 μ l der Suspension wurden mit 5 μ l des FITC-konjugierten VCAM-1-Antikörpers im Dunkeln bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Die Zellen wurden dann in 3 ml PBS aufgenommen und bei 550 g 10 min zentrifugiert, um ungebundene Antikörper abzuwaschen. Nach Fixierung der Zellen mit 1% Paraformaldehyd (Sigma) wurde die Durchflußzytometrie innerhalb von 12 Stunden durchgeführt. Die Antikörperbindung wurden mit Hilfe eines FACScan Caliburs (Becton-Dickinson, Heidelberg) analysiert, der mit einem Argon-Laser von 500 mW bei einer Wellenlänge von 488 nm ausgerüstet ist. Das Gerät wurde mit

standardisierten fluoreszierenden Microbeads kalibriert (CaliBRITE, Becton-Dickinson). Es wurde bis zu einer Gesamtzahl von 5000 Ereignissen gemessen, wobei die Flußrate 50 bis 100 Ereignisse/sec betrug. Die gewonnenen Daten wurden logarithmisch dargestellt.

2.8 ELISA

Die Überstände der Kokultivierung wurden bis zur Untersuchung mittels ELISA bei -20°C aufbewahrt. Die Konzentrationen an IL-1 β und IL-6 wurden mittels Immunoassays vom Sandwichtyp bestimmt, wobei im ersten Schritt die Probe zu einem monoklonalen Antikörper gegen das jeweilige Interleukin pipettiert wird und sich in einem zweiten Schritt nach Zugabe eines enzymmarkierten polyklonalen Antikörpers ein Sandwichkomplex ausbildet. Mit Zugabe einer chromogenen Lösung beginnt die Bildung eines farbigen Endprodukts, bei dem die Farbintensität proportional zur Interleukinmenge in der Probe ist und dessen Absorption bei 450 nm gemessen wird. Die Nachweisgrenze beträgt 3,9 ng/l für den IL-1 β ELISA (R&D Systems) und 30 ng/l für den IL-6 ELISA (DPC Biermann).

2.9 Western Blot

Die IL-6 Proteinexpression nach Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen wurde mittels Western Blot untersucht. Nach 1:4 Verdünnung mit Auftragspuffer (12,5 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,01% SDS, 2,25% Glycerin, 1% Mercaptoethanol, 0,2% Bromphenolblau, 200 μ M EDTA) wurden 70 μ g der Proteinextrakte aus dem Überstand der Kokultivierung 5 min bei 95°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proteine in einem diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgel (Sammelgel: 0,125 mM Tris-HCl pH 6,8, 2 mM EDTA, 0,1% SDS, 4,5% Acrylamid/Bisacrylamid; Trenngel: 0,375 mM Tris-HCl pH 8,8, 4 mM EDTA, 0,1% SDS, 9% Acrylamid/Bisacrylamid; Laufpuffer: 50 mM Tris-HCl pH 8,5, 0,1% SDS, 0,4 M Glycin, 1,6 mM EDTA). Zur Feststellung der

Proteingrößen wurde gleichzeitig ein vorgefärbter Molekulargewichtsstandard (Low Range, Biorad, München) aufgetragen. Daraufhin wurden die Gele im Transferpuffer (25 mM Tris-HCl pH 8,3, 0,2 M Glycin) äquilibriert. Im Wet Blot-Verfahren erfolgte der Transfer der Proteine auf eine ebenfalls äquilibrierte Nitrozellulosemembran (200 mA, 30 V, 30-50 min). Die gewaschenen Membranen wurden anschließend mit Ponceau S (Sigma) gefärbt, um eine gleichmäßige Übertragung der Proteine aus den Gelen zu dokumentieren.

Die nächsten Schritte dienten dem Nachweis des IL-6 Proteins auf der Membran. Dafür wurden zuerst über 1 h unspezifische Bindungen mit 2% Magermilchpulver und 2% Tween 20 in 1×TBS (100 mM Tris pH 7,8, 150 mM NaCl) bei RT auf dem Schüttler blockiert. Dann erfolgte über Nacht bei 4°C die Inkubation mit 10 µg/ml IL-6 Antikörper (DPC Biermann) in 1×TBS. Nichtgebundener Antikörper wurde mit Waschpuffer (0,5% Magermilchpulver, 0,2% Tween 20 in 1×TBS) entfernt und die Membran mit einem zweiten Anti-Maus-Ig-Biotin-Antikörper (Biorad) in einer Verdünnung von 1:1000 in 1×TBS über 2 Stunden inkubiert. Nach Entfernen ungebundener Antikörper wurde eine Streptokokken-Avidin-Alkalische Phosphatase (Biorad) in einer Verdünnung von 1:2000 in 1×TBS hinzugegeben. Das Glykoprotein Avidin bindet spezifisch Biotin und blockiert Biotin-abhängige Reaktionen. Nach erneutem Waschen der Membran wurde über 20 min eine Substratplatte (Biorad) zugegeben und die Antigen-Antikörper-Komplexe mittels enzymatischer Farbreaktion sichtbar gemacht.

2.10 RNA-Präparation

2.10.1 RNA-Isolation aus eukaryonten Zellen und Gewebe

Da die Gefahr besteht, daß die RNA durch RNasen degradiert wird, wurden alle Arbeitsschritte mit autoklavierten Materialien und Lösungen durchgeführt.

Die Kokultivierung wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Anstatt HUVEC und Monozyten wurden in den RNA-Versuchen ECV 304 und mononukleäre Zellen verwendet, da sich die immortale Endothelzelllinie als stabiler erwiesen hat

und eine größere RNA-Ausbeute zu erwarten ist. In Vorversuchen haben wir gesehen, daß das Expressionsmuster für IL-1 β und IL-6 vergleichbar mit der Kokultivierung von HUVEC mit Monozyten ist. Die mRNA wurde für jeden Zelltyp getrennt nach 2- und nach 6-stündiger Kokultivierung analysiert. Dabei wurden die Endothelzellen zweimal mit Zellmedium gewaschen, um nicht-adhärenente MNC zu sammeln. Adhärenente MNC wurden durch zweimaliges Waschen mit eiskaltem 0,02% EDTA-PBS pH 7,4 für je 3 min von den ECV gelöst. Die Gesamt-RNA von ungefähr 10^7 ECV und $2,5 \times 10^7$ MNC wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden) isoliert. Die Lyse der Zellen erfolgte mit 600 μ l Lysis Puffer. Das Lysat wurde direkt in die sogenannte QIAshredder column pipettiert und 1 Minute bei 13000 g zentrifugiert, um das Lysat zu homogenisieren. Die anschließende Zentrifugation für 3 min bei 13000 g diente dazu, weiterhin unlösliches Material zu entfernen. Nach Zugabe von 600 μ l 70% Ethanol wurde das homogenisierte Lysat auf die sogenannte RNeasy spin column pipettiert und 15 Sekunden bei 8000 g zentrifugiert. Die RNA bindet an die Silikongelmembran in der Säule. Nach Waschen der Säule mit 700 μ l des Waschpuffer RW1 und mit 500 μ l des Waschpuffers RPE für je 15 Sekunden bei 8000 g wurde in einem weiteren Zentrifugationsschritt die Säule mit 500 μ l RPE-Puffer für 2 min bei 13000 g getrocknet und die RNA mit 30 μ l (MNC) bzw. 50 μ l (ECV) DEPC-Wasser eluiert.

2.10.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Konzentration wurde im Photometer (Spectrophotometer DU 640, Fa. Beckmann) mit Hilfe der optischen Dichte bestimmt. Die Messung bei 260 nm gibt dabei den RNA-Gehalt an, bei 280 nm wird der Proteingehalt und bei 320 nm der Phenolgehalt der Probe angezeigt. Der Quotient zwischen 260 nm und 280 nm ist ein Maß für die Proteinverunreinigung der Probe. Er lag bei allen Versuchen im Normbereich zwischen 1,7 und 2,0. Die Proben wurden für die Messung 1:100

verdünnt. Die RNA-Konzentration wurde nach der Formel $\text{Konzentration in } \mu\text{g}/\mu\text{l} = \text{Extinktion} \times \text{Verdünnung} \times 0,04$; ermittelt.

2.11 Northern Blot

2.11.1 Denaturierung und Auftrennung der RNA

Die RNA wird bei der verwendeten Methode elektrophoretisch in einem denaturierenden Formaldehyd-Agarose-Gel aufgetrennt und dann durch Diffusion auf Nylonmembranen transferiert. Dafür wurden die RNA-Proben für 10 min auf 56°C erhitzt, um Einzelstränge zu erhalten. Zu 5 µg RNA wurden Northern Sample Buffer (3×maximale Menge an RNA; 200 µl Formamid, 70 µl 37% Formaldehyd, 40 µl 5×MOPS-Puffer (Sigma)), Bromphenolblau ((maximale Menge an RNA+Menge an Northern Sample Buffer):5) und 0,1 µl Ethidiumbromid pipettiert und die Proben auf ein 1,2% Agarose-Gel (1,2 g Agarose, 62 ml DEPC-Wasser, 20 ml 5×MOPS-Puffer, 18 ml 37% Formaldehyd) aufgetragen. Das Bromphenolblau hat dabei die Aufgabe, die Gelfront zu markieren und das Ethidiumbromid wird verwendet, um ribosomale RNA im UV-Licht sichtbar zu machen. Daran kann man erkennen, ob in allen Spuren gleich viel RNA geladen ist.

Die RNA wurde für 4,5 Stunden bei 75 V mit MOPS-Laufpuffer aufgetrennt.

2.11.2 Blotting der RNA auf Nylonmembranen

Die RNA wurde über Nacht mit Hilfe von Kapillarkräften auf eine Nylonmembran (Hybond-N, Amersham, Freiburg) transferiert. Das Blotting der RNA wurde in 20×SSC (3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat-Dihydrat, pH 7,0) durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die Nylonmembran kurz getrocknet und dann für 2 Stunden bei 80°C gebacken, um die RNA an die Membran zu binden.

2.11.3 Radioaktive Markierung der DNA-Sonden

Als DNA-Sonden wurden für IL-6 das 1,0 kb EcoRI Fragment des Vektors p91023 (B) (ATCC), für IL-1 β das 1,05 kb PST-1 Fragment des Vektors pBR322 (ATCC) und für GAPDH das 1,3 kb PST-1-Xba Fragment von pUC 18 (Dr. R. Beck, Toxikologisches Institut, Universität Mainz) verwendet. Die cDNA-Sonden wurden mit Hilfe des Random Primer Labeling Kits (Stratagene, Heidelberg) radioaktiv markiert. Dafür wurden zu 25 ng der DNA 10 μ l random oligonucleotide primers pipettiert und anschließend bei 95°C für 5 min hitzedenaturiert. Nach einer kurzen Zentrifugation wurden 5 μ l des radioaktiv markierten Nukleotids [α^{32} P]-dCTP mit einer Aktivität von mindestens 6000 Ci/mmol (Amersham), 10 μ l des dCTP-Puffers und 1 μ l Klenow-Enzym zugegeben und bei 37°C für 10 min inkubiert. Während dieser Zeit kommt es zum Einbau der Nukleotide in die DNA-Sonde. Um nicht-eingebaute Nukleotide zu entfernen, wurden die radioaktiv markierten Sonden über eine Gelfiltrationssäule gegeben (Probe Purification Columns, Stratagene). Die Aktivität der Sonden wurde im β -Counter in cpm gemessen.

2.11.4 Hybridisierung der Blots

Die Blots wurden für 15 min mit der Prähybridisierungslösung (Quick Hyb, Stratagene) bei 68°C vorinkubiert. In der Zwischenzeit wurde die radioaktiv markierte Sonde mit ds-salmon sperm-DNA (Gibco) für 2 min bei 95°C erhitzt, um Einzelstränge zu erhalten. Die ds-salmon sperm-DNA dient dazu, unspezifische Bindungen der Sonde zu verhindern. Diese Lösung wurde dann zu der Prähybridisierungslösung pipettiert und die Filter über 2 Stunden bei 68°C inkubiert. Anschließend wurden die Filter zuerst 2 \times 20 min bei 42°C in 2 \times SSC/0,1% SDS, danach 2 \times 20 min bei 60°C in 0,1 \times SSC/0,1% SDS gewaschen.

Die Filter wurden in Folie eingeschweißt und auf Röntgenfilme (BioMax MS, Kodak) aufgelegt. Die radioaktiven Banden werden so mittels Autoradiographie sichtbar gemacht.

Die Bandengröße der Signale wurde mit Hilfe der vorher auf dem Filter markierten 28-S-(4,7 kbp) und 18-S-(1,9 kbp) Banden der ribosomalen RNA festgestellt.

Um sicherzustellen, daß bei jeder Probe gleiche Mengen an RNA eingesetzt wurden, wurde die Signalintensität in Beziehung zur 28-S-Bande der ribosomalen RNA gesetzt und zusätzlich jeder Filter mit einer Sonde für das konstitutionell exprimierte GAPDH-Gen hybridisiert.

Alle Ergebnisse wurden mit RNA von Zellen wiederholter Versuche und neu markierten DNA-Sonden reproduziert.

2.12 Gelretardierungsassay

Mit Hilfe des Gelretardierungsassays kann man DNA-bindende Transkriptionsfaktoren nachweisen. Dafür wurden Endothelzellen für 60 min mit mononukleären Zellen inkubiert und wie oben beschrieben separiert. Als Kontrolle dienten unstimulierte und vorstimulierte Endothelzellen sowie mononukleäre Zellen.

2.12.1 Isolierung nukleärer und zytosolischer Extrakte

Die zellulären Extrakte wurden nach einem in der Literatur angegebenen und leicht abgewandelten Verfahren isoliert (Mackman et al 1991). Dazu wurden die Proben für 7 min mit 200 g abzentrifugiert und einmal in PBS gewaschen. Die Zellpellets wurden in 50 µl Puffer A (10 mM HEPES pH 8,0, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,5 mM DTT, 300 mM Sucrose, 0,1% Nonidet P-40, 0,5 mM PMSF, 0,1 µg/ml Leupeptin, je 1,0 µg/ml Pepstatin, Antipain, Chymostatin, Aprotinin) resuspendiert. Dieser Schritt diente dazu, die Zellen zu lysieren. Nach dem

anschließenden Zentrifugationsschritt (16000 g, 10 sec) wurde der Überstand mit der zytosolischen Fraktion von den noch intakten Zellkernen abgenommen und bei -80°C gelagert. Um eine Kontamination der nukleären Extrakte durch zytosolische Proteine zu vermeiden, wurden die Kerne einmal in Puffer A gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Pellets wurden daraufhin in Puffer B (20 mM HEPES pH 8,0, 20% Glycerol, 100 mM KCl, 100 mM NaCl, 0,5 mM PMSF, 0,5 mM DTT; Proteaseinhibitoren wie in Puffer A) aufgenommen und die Kernmembranen mit Hilfe eines Ultraschalldesintegrators zerstört. Durch Zentrifugation (16000 g, 10 sec) ließen sich die Membranfragmente abtrennen. Die nukleären Proteine wurden ebenfalls bei -80°C aufbewahrt. Die Proteinkonzentrationen der zytosolischen und nukleären Extrakte wurden mit dem Bradford-Assay (Biorad) durch Messung des nach der Bindung an Proteine verschobenen Absorptionsmaximums von Coomassie Brilliant Blau G-250 bei 595 nm bestimmt.

2.12.2 Gelretardierungsassay

Die Anwesenheit von DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren in nukleären Extrakten läßt sich mittels Gelretardierungsassay nachweisen, in dem doppelsträngige Oligonukleotide mit Erkennungssequenzen für die jeweiligen Transkriptionsfaktoren zum Einsatz kommen. Als NF- κ B-Konsensussequenz wurde ein Oligonukleotid mit dem prototypischem Ig κ -Motiv (5'-CAGAGGGACTTTCCGAGA-3') eingesetzt. Dieses Oligonukleotid wurde in Anwesenheit der erforderlichen Nukleotide durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I (Boehringer Mannheim) mit [α - ^{32}P]dCTP (> 3000 Ci/mmol; NEN, Brüssel, Belgien) markiert. Als Kontrollen wurden Oligonukleotide mit Erkennungssequenzen für den konstitutiv aktivierten Transkriptionsfaktor Sp-1 (5'-ATTCGATCGGGGCGGGGCGAGC-3') verwendet, die mittels T4-Polynukleotidkinase (Boehringer Mannheim) mit [γ - ^{32}P]ATP (>5000 Ci/mmol; NEN) markiert wurden. Nicht gebundene Nukleotide konnten über eine Sephadex

G25-Säule (Boehringer Mannheim) abgetrennt werden. Gleiche Mengen an extrahierten nukleären Proteinen (2-5 μg) wurden in Bindepuffer (20 mM Hepes pH 7,9, 50 mM KCl, 1 mg/ml BSA, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,1% Nonidet P-40, 5% Glycerin, 50 ng Poly[d(I-C)]/ μl (Boehringer Mannheim)) aufgenommen und 30 min mit der radioaktiv markierten DNA-Probe (10 ng, 10^5 cpm) inkubiert. Nach Zugabe des Laufpuffers (0,25 \times TBE Puffer, 40% Glycerin, 0,2% Bromphenolblau) erfolgte anschließend die Auftrennung der Proteine in einem 6% Polyacrylamidgel in 0,25 \times TBE Puffer (10 \times TBE-Puffer: 1,0 M Tris pH 8,4, 0,9 M Borsäure, 10 mM EDTA). Qualität und gleichmäßige Proteinkonzentrationen der untersuchten nukleären Extrakte wurden parallel durch Inkubation mit dem Sp-1-Oligonukleotid überprüft. Die quantitative Auswertung der getrockneten Gele erfolgte mittels Autoradiographie (DuPont, Bad Homburg) und Densitometrie (MWG-Biotech, Ebersberg).

2.13 Statistik

Die Ergebnisse wurden, soweit nicht anders beschrieben, als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts angegeben.

Unterschiede zwischen 2 Variablen wurden durch den gepaarten t-Test und Unterschiede zwischen ≥ 3 Variablen wurden mittels ANOVA (SPSS Version 8.0) analysiert.

Ein p-Wert im zweiseitigen Test kleiner als 0,05 wurde als signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis der IL-6- und IL-1 β Freisetzung in der Kokultivierung von Endothelzellen mit mononukleären Zellen bzw. Monozyten

3.1.1 Nachweis der IL-6 Freisetzung in der Kokultivierung von Endothelzellen mit mononukleären Zellen

Um die Freisetzung von IL-6 nachzuweisen, wurden Endothelzellen mit mononukleären Zellen inkubiert. Ein Teil der Endothelzellen wurde vorher über 16 Stunden mit IFN γ , ein anderer Teil mit TNF α voraktiviert. Nach 24 stündiger Inkubation wurden die Überstände in den Western Blot eingesetzt und auf IL-6 hin untersucht.

Der Western Blot zeigte, daß es in der Kokultivierung mit unstimulierten Endothelzellen zu einer geringen Freisetzung von IL-6 kommt. Durch Vorstimulation mit IFN γ und vor allem TNF α konnte die IL-6 Produktion gesteigert werden. Die Monozyten alleine sezernierten kaum IL-6. In ruhenden und in voraktivierten Endothelzellen ließ sich kein IL-6 nachweisen. Als Positivkontrolle dienten mit IL-1 β stimulierte Endothelzellen. Um zu zeigen, daß im Western Blot IL-6 nachgewiesen wird, diente als Kontrollprobe rekombinantes humanes IL-6.

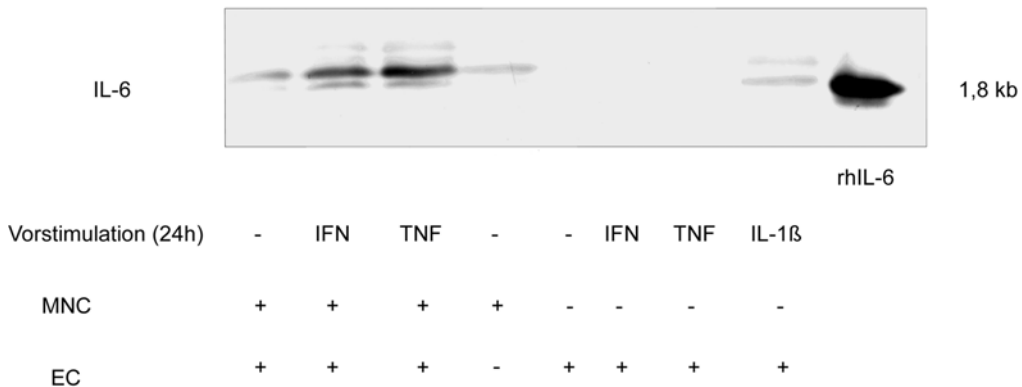


Abb.2: IL-6 Freisetzung in der Kokultivierung von Endothelzellen mit mononukleären Zellen im Western Blot

Die Abbildung zeigt die Analyse des Western Blots für IL-6 im Überstand nach 24 stündiger Kokultivierung von ruhenden und IFN γ - bzw. TNF α -vorstimulierten Endothelzellen mit mononukleären Zellen. Als Kontrolle diente der Überstand von mononukleären Zellen bzw. ruhenden und vorstimulierten Endothelzellen ohne Kokultivierung. Als Positivkontrolle diente der Überstand von Endothelzellen, die mit IL-1 β vorstimuliert waren. EC steht für Endothelzellen, MNC für mononukleäre Zellen, rhIL-6 für rekombinantes IL-6.

3.1.2 Nachweis der IL-6 Freisetzung als IL-1 β abhängiger Prozeß

Um die IL-6 Produktion zu quantifizieren, wurden die Überstände in den ELISA eingesetzt. Im IL-6 ELISA bestätigten sich die Ergebnisse aus dem Western Blot. In der Kokultivierung mit ruhendem Endothel war die IL-6 Produktion signifikant geringer ($9,2 \pm 1,0$ ng/24h; $P=0,0015$) als in der mit IFN γ voraktivierten Kokultivierung ($46,6 \pm 7,0$ ng/24h) und erreichte damit nur ungefähr 20% der maximalen IL-6 Produktion. Da bekannt ist, daß die IL-6-Synthese durch IL-1 β induziert werden kann (Sironi et al 1989), wurden die Überstände der Kokultivierung in einen IL-1 β ELISA eingesetzt. Die Freisetzung von IL-1 β war in der voraktivierten Kokultivierung um das 3fache höher ($40,6 \pm 3,0$ pg/24h; $P=0,002$) als in der Kokultivierung mit ruhendem Endothel ($13,7 \pm 0,6$ pg/24h). In den Überständen von ruhendem und mit IFN γ voraktiviertem Endothel alleine

lagen sowohl die Menge an IL-6 als auch die an IL-1 β unterhalb der Nachweisgrenze. Ebenso konnte in Monozytenmonokulturen kein IL-6 nachgewiesen werden und die Menge an IL-1 β lag gerade über der Nachweisgrenze ($4,6 \pm 0,9$ pg/24h).

Um die Abhängigkeit der IL-6- von der IL-1 β -Produktion zu zeigen, wurde ein Antagonist gegen den IL-1 Rezeptor in den Inkubationsansatz gegeben. In Anwesenheit des IL-1 RA erreichte die IL-6 Freisetzung Werte wie in der Kokultivierung mit ruhendem Endothel ($8,6 \pm 1,3$ pg/24h). Die Hemmung von IL-1 durch den IL-1 RA hatte jedoch keinen Einfluß auf die IL-1 β Freisetzung ($36,9 \pm 4,4$ pg/24h; $P=0,0025$). (siehe Abb.6).

	IL-1 β Protein (pg/24h)	IL-6 Protein (ng/24h)
Ruhende EC	$13,7 \pm 0,6$	$9,2 \pm 1,0$
Stimulierte EC	$40,6 \pm 3,0$	$46,6 \pm 7,0$
Stimulierte EC + IL-1 RA	$36,9 \pm 4,4$	$8,6 \pm 1,3$

Abb.3: IL-1 β und IL-6 Freisetzung in der Kokultivierung von Endothelzellen mit Monozyten im ELISA

Die Abbildung zeigt die Menge an IL-1 β und IL-6 im Überstand nach 24 stündiger Kokultivierung von ruhenden bzw. IFN γ -stimulierten Endothelzellen mit und ohne Zugabe eines IL-1 Rezeptorantagonisten mit Monozyten. EC steht für Endothelzellen.

3.1.3 Kinetik der Freisetzung von IL-6 und IL-1 β

Um zu sehen, ob IL-1 β und IL-6 zeitabhängig freigesetzt werden, haben wir die Überstände der Kokultivierung nach 6, 12, 18 und 24 Stunden in den ELISA eingesetzt. Auch in der Kinetik zeigte sich, daß die Konzentration beider Zytokine in der voraktivierten Kokultivierung das 3-5 fache der Konzentration in der Kokultivierung mit ruhendem Endothel betragen. Das Maximum der IL-1 β Produktion war bereits nach 18 Stunden erreicht ($94,00 \pm 7,85$ pg/ml), während

das Maximum der IL-6 Freisetzung erst nach 24 Stunden stattfand ($38,33 \pm 6,65$ ng/ml).

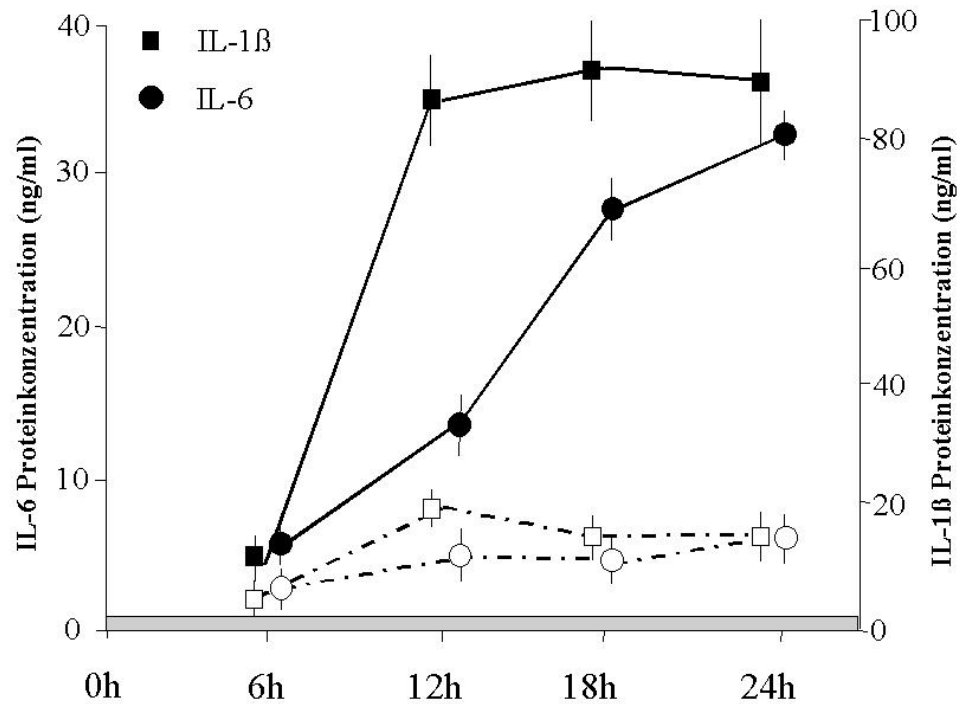


Abb.4: Kinetik in der Freisetzung von IL-1 β und IL-6 nach Kokultivierung von Endothelzellen mit Monozyten im ELISA.

Die Abbildung zeigt die Menge an IL-1 β und IL-6 im Überstand nach 24 stündiger Kokultivierung von ruhenden (offene Symbole) bzw. IFN γ -stimulierten (gefüllte Symbole) Endothelzellen mit Monozyten. Die Werte repräsentieren den Mittelwert \pm Standardfehler aus 3 Versuchen.

3.1.4 Nachweis der IL-6 mRNA und der IL-1 β mRNA nach Kokultivierung von mononukleären Zellen mit ECV-304

Um die zelluläre Herkunft von IL-1 β und IL-6 herauszufinden, haben wir nach der Kokultivierung die Zellen voneinander getrennt und die mRNA auf IL-1 β und IL-6 hin untersucht.

Die Ergebnisse der Transkription der Zytokine werden anhand eines repräsentativen Experiments aufgezeigt, welches dreimal reproduziert wurde.

In nicht-koinkubierten mononukleären Zellen und unstimulierten Endothelzellen konnte weder für IL-1 β noch für IL-6 eine Expression nachgewiesen werden. Auch die Stimulation von ECV-304 mit IFN γ hatte keinen Effekt auf die Zytokintranskription. Die Adhäsion von mononukleären Zellen an ECV-304 führte zu einer Zunahme der Expression von IL-1 β in mononukleären Zellen mit einem Maximum nach 2 Stunden und von IL-6 in ECV-304 nach 6 Stunden. Sowohl die Expression der IL-1 β mRNA in mononukleären Zellen als auch der IL-6 mRNA in ECV-304 waren bedeutend geringer, wenn nicht-aktivierte ECV-304 für die Kokultivierung eingesetzt wurden. Die GAPDH-Bande zeigt an, daß in allein Proben die Menge an mRNA nahezu gleich groß war.

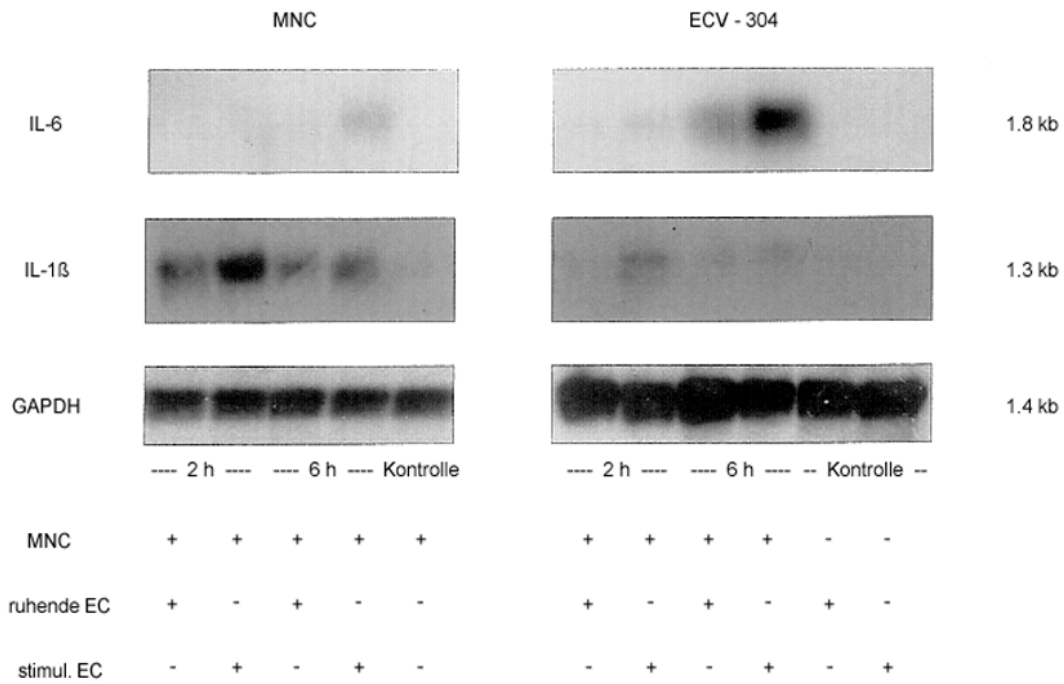


Abb.5: IL-1 β und IL-6 mRNA Expression in ECV-304 und mononukleären Zellen nach Kokultivierung im Northern Blot.

Die Abbildung zeigt die Analyse des Northern Blots für die mRNA von IL-1 β und IL-6 nach zwei- bzw. sechsstündiger Kokultivierung in mononukleären Zellen und in ruhenden bzw. IFN γ -vorstimulierten Endothelzellen.

Die verschiedenen Versuchsbedingungen sind unterhalb der Abbildung angegeben. EC steht für Endothelzellen, MNC für mononukleäre Zellen.

3.2 Hemmung der IL-1 β - und IL-6 Freisetzung durch Blockierung der Adhäsion

3.2.1 Immunfluoreszenzmessung von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen

Frühere Versuche zeigten, daß die Kokultivierung von Endothelzellen und Monozyten zu einem Anstieg der endothelialen Expression von VCAM-1 und ICAM-1 führt (Takahashi et al 1996). In unseren Versuchen induzierte die Inkubation von IFN γ -stimuliertem Endothel mit Monozyten im FACS eine Steigerung der VCAM-1 Expression um $300\pm 17\%$ im Vergleich zu nicht-aktivierten Endothelzellen ($P=0,02$). Durch Hemmung von IL-1 konnte die Oberflächenexpression von VCAM-1 inhibiert werden ($123\pm 18\%$; $P=0,048$, verglichen mit Versuchen in Abwesenheit von IL-1 RA). Nach der Inkubation von nicht-aktiviertem Endothel mit Monozyten konnten wir nur eine leichte Zunahme der VCAM-1 Expression beobachten ($124\pm 11\%$; $P=0,95$).

3.2.2 Hemmung der IL-1 β - und IL-6 Freisetzung durch mechanische Blockade der Adhäsion und durch adhäsionsinhibierende Antikörper

Wir untersuchten, ob die Zytokinproduktion abnimmt, wenn Endothelzellen und Monozyten nicht direkt über Zell-Zell-Interaktion miteinander interagieren können. Dies wurde durch den Einsatz sogenannter Transwell-Kammern erreicht, durch deren Poren die Zellen zwar mittels löslicher Stoffe kommunizieren können, Monozyten jedoch nicht zum adhären Endothel hindurchdiffundieren können. Die Kokultivierung von Monozyten mit voraktiviertem Endothel in den Transwell-Kammern führte zu einer Abnahme der Konzentration von IL-1 β und IL-6 auf Werte, die bei der direkten Kokultivierung mit ruhendem Endothel erzielt wurden.

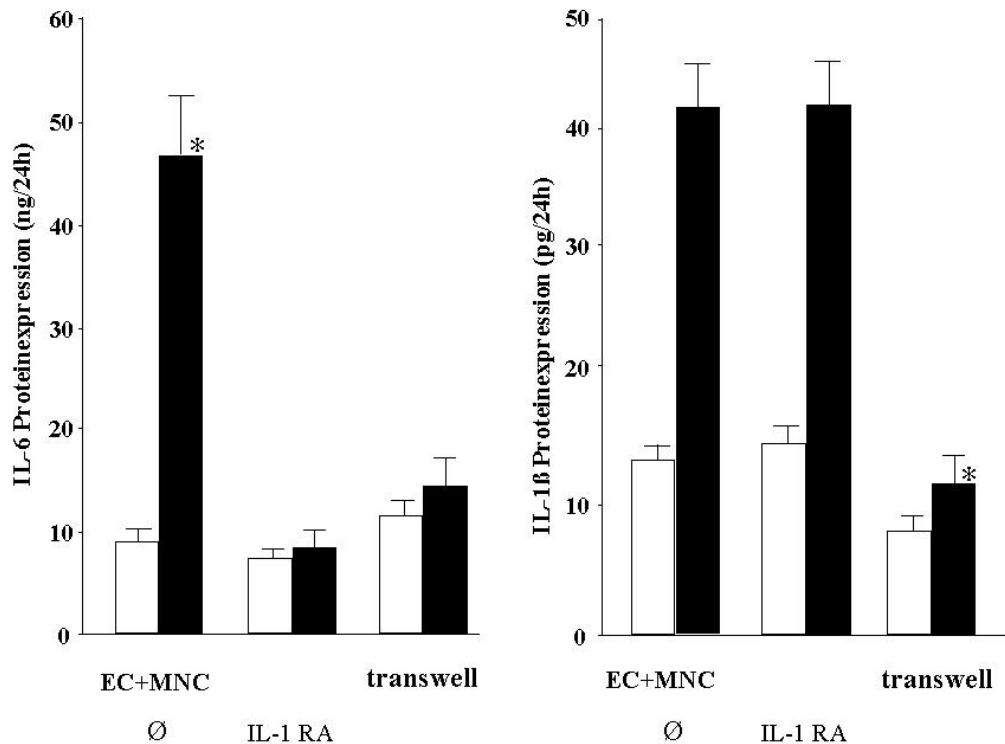


Abb.6: Hemmung der IL-1 β und IL-6 Freisetzung nach Kokultivierung von Endothelzellen mit Monozyten mit einem IL-1 Rezeptorantagonisten und mit Transwell-Kammern im ELISA.

Die Abbildung zeigt die Menge an IL-1 β und IL-6 im Überstand nach 24 stündiger Kokultivierung von ruhenden (hell) bzw. IFN γ -vorstimulierten (dunkel) Endothelzellen mit Monozyten mit und ohne Zugabe eines IL-1 Rezeptorantagonisten bzw. mit Einsatz einer Transwell-Kammer. Die Werte repräsentieren den Mittelwert \pm Standardfehler aus 6 Versuchen.

EC steht für Endothelzellen, MNC für mononukleäre Zellen. *, $P < 0,01$ im Vergleich zu 2 anderen Versuchsreihen mit stimulierten HUVEC.

Durch Zugabe eines inhibierenden VCAM-1 Antikörpers konnte in der Kokultivierung mit aktiviertem Endothel sowohl die IL-6 Produktion ($16,54 \pm 0,95$ ng/24h) als auch die IL-1 β Produktion ($18,40 \pm 1,10$ ng/24h) deutlich vermindert werden, während ein blockierender ICAM-1 Antikörper keinen inhibierenden Effekt hatte. Der gleiche Effekt konnte auch durch einen blockierenden Antikörper gegen den VLA-4 Rezeptor erreicht werden, wobei

sowohl ein Antikörper gegen die $\beta 1$ -Untereinheit ($13,82 \pm 1,52$ ng/24h für IL-6 und $21,90 \pm 1,09$ pg/24h für IL-1 β) als auch gegen die $\alpha 4$ -Untereinheit ($10,70 \pm 1,33$ ng/24h für IL-6 und $23,72 \pm 1,21$ pg/24h für IL-1 β) in der Kokultivierung von aktiviertem Endothel und Monozyten erfolgreich war. Ähnlich wie der ICAM-1 Antikörper hatten weder Antikörper gegen E-Selektin, P-Selektin oder L-Selektin, alleine oder in Kombination, einen inhibitorischen Effekt.

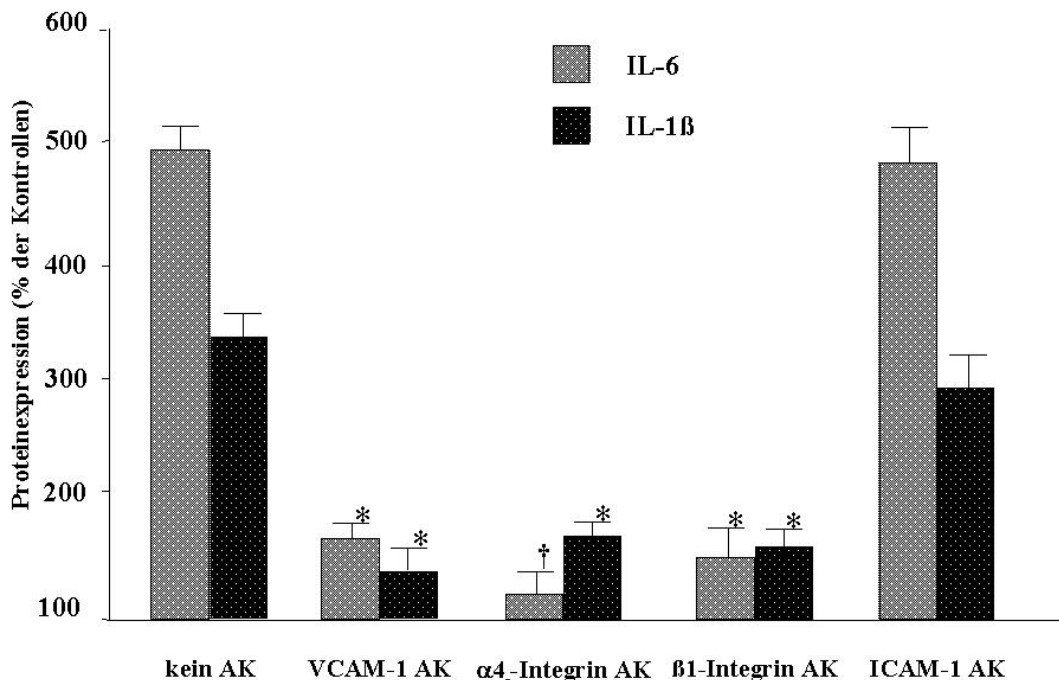


Abb.7: Hemmung der IL-1 β und IL-6 Freisetzung nach Kokultivierung von IFN γ -vorstimulierten Endothelzellen mit Monozyten mit inhibitorischen Antikörpern gegen Adhäsionsmoleküle im ELISA.

Die Abbildung zeigt die Menge an IL-1 β und IL-6 im Überstand nach 24 stündiger Kokultivierung von IFN γ -vorstimulierten Endothelzellen mit Monozyten ohne und mit Zugabe von Antikörpern gegen VCAM-1, ICAM-1 und die $\alpha 4$ - und $\beta 1$ -Untereinheit des VLA4-Rezeptors. Die Werte repräsentieren den Mittelwert \pm Standardfehler aus 6 Versuchen.

EC steht für Endothelzellen, MNC für mononukleäre Zellen, AK für Antikörper.

*, $P < 0,05$ und †, $P < 0,01$ im Vergleich zu Versuchen ohne Antikörper.

3.3 Nachweis der NF- κ B Aktivierung in der Kokultivierung von Endothelzellen mit mononukleären Zellen

Die Kernextrakte beider Zelltypen wurden nach einer 60minütigen Kokultivierung getrennt im Gelretardierungsassay auf eine NF- κ B-Aktivierung untersucht. Um ausreichende Mengen an Kernextrakten zur Bestimmung von NF- κ B zu erhalten, haben wir auch bei diesen Versuchen mononukleäre Zellen und ECV-304 eingesetzt. Die Ergebnisse der NF- κ B-Aktivierung werden anhand eines repräsentativen Experiments aufgezeigt, welches dreimal reproduziert wurde.

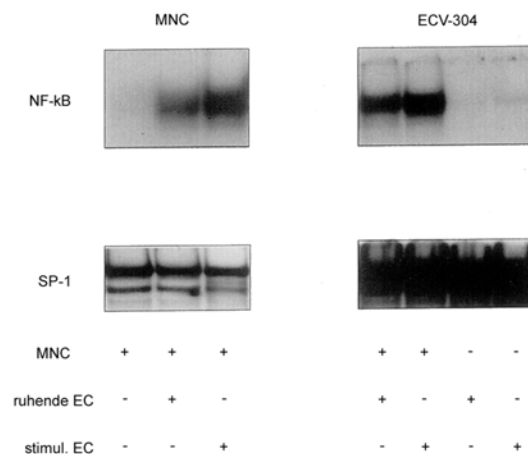


Abb.8: NF- κ B Aktivierung in ECV-304 und mononukleären Zellen nach Kokultivierung im Gelretardierungsassay.

Die Abbildung zeigt die Aktivierung von NF- κ B nach einstündiger Kokultivierung in mononukleären Zellen und in ruhenden bzw. IFN γ -vorstimulierten Endothelzellen. Die verschiedenen Versuchsbedingungen sind unterhalb der Abbildung angegeben. EC steht für Endothelzellen, MNC für mononukleäre Zellen.

In nicht-inkubierten mononukleären Zellen und in ruhendem wie auch in IFN γ -voraktiviertem Endothel war keine Aktivierung von NF- κ B nachzuweisen. Nach Kokultivierung von mononukleären Zellen mit IFN γ -voraktivierten ECV-304 konnten wir eine starke Aktivierung von NF- κ B in beiden Zelltypen beobachten. Eine leichte Aktivierung von NF- κ B konnten wir auch in der Kokultivierung mit unaktiviertem Endothel sehen. Die SP-1 Bande zeigt an, daß in allen Proben der Proteingehalt gleich groß war.

3.4 Nachweis der endothelialen IL-6-Freisetzung nach Stimulation mit Plasmen von Patienten mit akutem Myokardinfarkt

Endothelzellen wurden über 24 Stunden mit Plasmen von Infarktpatienten inkubiert und die Überstände im ELISA auf IL-6 untersucht. Die Plasmen wurden 24 bis 48 Stunden nach PTCA und Stentimplantation von Patienten mit akutem Myokardinfarkt gewonnen und enthielten im Mittel 330 ± 13 ng/l IL-6. Bei allen Patienten lag der Gehalt an IL-1 β unterhalb der Nachweisgrenze. Als Kontrolle dienten Plasmen von Patienten, die einer elektiven PTCA unterzogen worden waren. In diesen Plasmen lag der IL-6 wie auch der IL-1 β Gehalt unterhalb der Nachweisgrenze. Die Inkubation von HUVEC mit Infarktplasmen induzierte in Endothelzellen die Freisetzung von IL-6 (2014 ± 230 pg/24h; $P < 0,001$). Mit Hilfe des IL-1 RA konnte die IL-6 Sekretion um $38 \pm 7\%$ vermindert werden (1256 ± 150 pg/24h; $P = 0,004$). Die Inkubation von Endothelzellen mit Plasmen aus der Kontrollgruppe führte nur zu einer geringen endothelialen IL-6 Freisetzung (475 ± 71 pg/24h), welche durch den IL-1 RA nicht inhibiert werden konnte ($P = 0,95$).

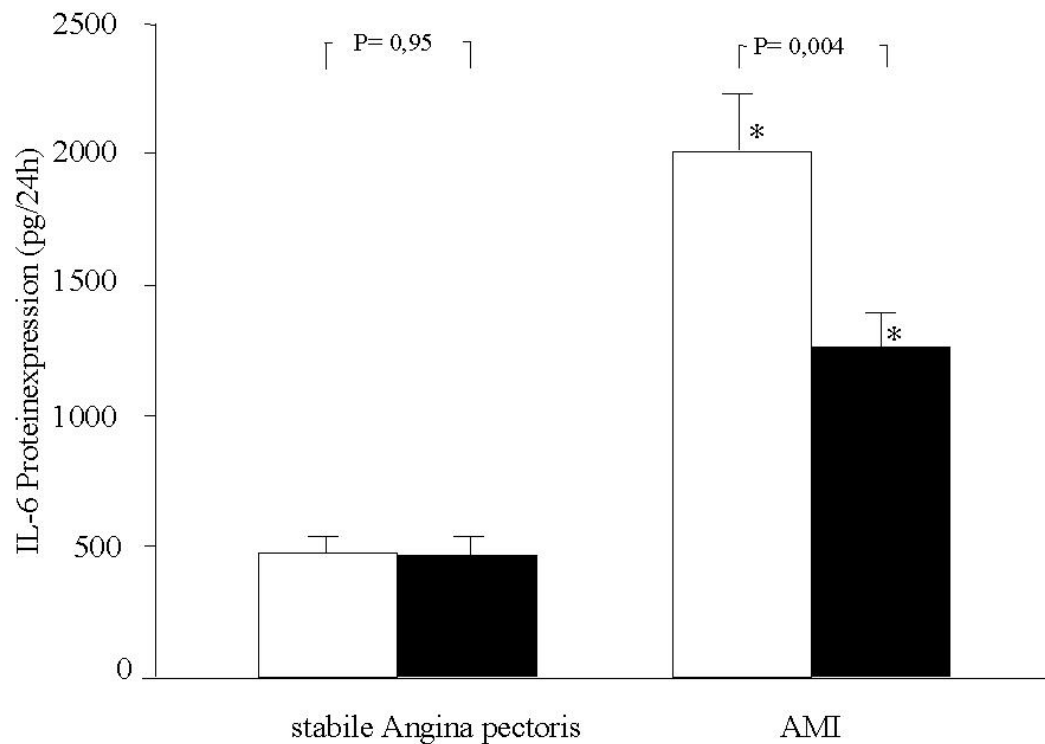


Abb.9: Endotheliale IL-6 Freisetzung nach Stimulation mit Plasmen von Patienten mit akutem Myokardinfarkt bzw. Plasmen von Patienten mit Angina pectoris und Hemmung der IL-6 Freisetzung mit einem IL-1-Rezeptorantagonisten im ELISA.

Die Abbildung zeigt die Menge an IL-6 im Überstand nach 24 stündiger Inkubation von Endothelzellen mit Plasmen von Patienten mit akutem Myokardinfarkt (weiß) und die Hemmung der IL-6 Freisetzung mit einem IL-1 Rezeptorantagonisten (schwarz). Als Kontrolle dienen Plasmen von Patienten mit stabiler Angina pectoris. Die Werte repräsentieren den Mittelwert \pm Standardfehler aus 6 Versuchen.

AMI steht für akuten Myokardinfarkt.

*, $P < 0,001$ im Vergleich zu Kontrollplasmen.

4 Diskussion

4.1 IL-6- und IL-1 β Freisetzung in der Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß die Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen zu einer Expression von IL-6 und IL-1 β führt. Allerdings kommt es bei der Adhäsion von Monozyten an ruhendes Endothel nur zu einer schwachen Expression von IL-6 und IL-1 β . In IFN γ -stimuliertem und in ruhendem, nicht kokubiertem Endothel kann kein IL-6 und IL-1 β nachgewiesen werden. Wie bereits in früheren Studien gezeigt wurde, interagieren ruhende Endothelzellen kaum mit Monozyten (Hakkert et al 1991). Nur in der Adhäsion von Monozyten mit voraktiviertem Endothel kommt es zu einem wesentlichen Anstieg der beiden Zytokine. Zahlreiche histologische Untersuchungen haben gezeigt, daß Myozyten und Endothelzellen nach Reperfusion ihren Phänotyp im Sinne einer Aktivierung ändern (Hearse et al 1993, Kukielka et al 1993, Kukielka et al 1995). Als Modell für aktiviertes Endothel wurden die HUVEC mit IFN γ vorstimuliert, da IFN γ die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen nicht über eine Aktivierung von NF- κ B fördert, wie bereits Baeuerle und Henkel (1994) demonstrierten, sondern über eine JAK-abhängige Aktivierung von STAT Transkriptionsfaktoren (Darnell et al 1994). TNF α im Gegensatz kann über NF- κ B die zelluläre Synthese von IL-1 sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen induzieren (Ross 1993, Baeuerle 1994). Das erklärt die weitere Zunahme der IL-6 Menge im Western Blot, wenn kokultivierte Endothelzellen mit TNF α vorstimuliert werden. Da das Hauptaugenmerk dieser Arbeit aber auf den beiden Zytokinen IL-1 und IL-6 und deren Wechselwirkung liegt, wurde in den nachfolgenden Versuchen auf eine Vorstimulation mit TNF α verzichtet.

4.2 Endotheliale IL-6 Produktion als IL-1 β abhängiger Prozeß

Die Zunahme der IL-6 Expression nach Adhäsion von Monozyten an IFN γ -vorstimuliertes Endothel konnte mit Hilfe eines IL-1 Rezeptorantagonisten inhibiert werden. Die IL-1 β Produktion wurde durch den IL-1 Rezeptorantagonisten nicht beeinflusst. Das beweist zum einen, daß die IL-6-Freisetzung ein IL-1 β -abhängiger Prozeß ist, zum anderen zeigt es, daß die IL-1 β Produktion kein autokrin gesteuerter Prozeß ist. Das stimmt mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen einher, die zeigten, daß IL-1 und verschiedene Stimuli wie LPS und TNF die IL-6 Produktion in Endothelzellen induzieren (Podor et al 1989, Le et al 1989) und daß Regionen im IL-6 Promotor direkt für die IL-1-vermittelte IL-6 Induktion zuständig sind (Isshiki et al 1990, Shimizu et al 1990). Endothelzellen können sowohl IL-1 β als auch IL-6 exprimieren (Sironi et al 1989, Podor et al 1989). Auch Monozyten setzen nach Stimulation mit IL-1 und LPS IL-6 frei (Tosato et al 1990). Die getrennte Analyse beider Zellen im Northern Blot nach Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen macht deutlich, daß Monozyten die Hauptquelle für IL-1 β und Endothelzellen die Produzenten von IL-6 sind. In Endothelzellen ist keine IL-1 β Freisetzung nachzuweisen und Monozyten zeigen lediglich einen leichten Anstieg von IL-6. Der Northern Blot verdeutlicht darüberhinaus, daß Monozyten bereits nach einer zweistündigen Adhäsion an das Endothel ein Maximum an IL-1 β mRNA produzieren, wohingegen Endothelzellen erst nach 6 Stunden einen maximalen Anstieg an IL-6 zeigen. Das untermauert die These, daß die IL-6 Freisetzung IL-1 β abhängig, dadurch zeitlich versetzt, abläuft. Sowohl auf Proteinebene als auch im Northern Blot wird deutlich, daß die monozytäre Adhäsion an vorstimuliertes Endothel zu einer wesentlich höheren Produktion an IL-6 und IL-1 β führt. In vivo sind die Monozyten sicherlich nicht die einzige Quelle für IL-1 β , da auch Thrombozyten IL-1 freisetzen, welches die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Zytokinproduktion in Endothelzellen induziert (Hawrylowicz et al 1991).

Einige Studien konnten im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit zeigen, daß Makrophagen eine Hauptquelle für IL-6 sind. In atheromatösen Veränderungen der Gefäßwand konnten Monozyten/Makrophagen nachgewiesen werden, die IL-6 freisetzen (Kishikawa et al 1993). Auch in das reperfundierte Myokard einwandernde Monozyten/Makrophagen konnten als Quelle von IL-6 identifiziert werden (Gwechenberger et al 1999). In dieser Arbeit konnte keine IL-6 mRNA Expression in Monozyten nachgewiesen werden. Der fehlende monozytäre IL-6 Nachweis könnte durch den zeitlichen Rahmen dieser Versuche erklärt werden. So war es das Ziel, die zellulären Mechanismen in der frühen Phase der Adhäsion zu untersuchen, in der sich der Monozyt noch nicht zu einem IL-6 produzierenden Makrophagen differenziert hat.

4.3 Freisetzung von Zytokinen als adhäsionsabhängiger Prozeß

In der Versuchsreihe mit Transwell-Kammern fiel die Zytokinproduktion von voraktiviertem Endothel und Monozyten auf Werte ab, die in der direkten Adhäsion von Monozyten mit ruhendem Endothel erreicht werden. Das zeigt, daß die Adhäsion von Endothelzellen und Monozyten eine zentrale Rolle bei der Expression von IL-1 β und IL-6 spielt. In weiteren Versuchen mit adhäsionsinhibierenden Antikörpern führte der VCAM-1-AK zu einer signifikant geringeren Produktion an IL-1 β und IL-6, wohingegen Antikörper gegen ICAM-1 und Selektine keinen Effekt hatten. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Expression von IL-1 β und IL-6 über eine VCAM-1/VLA-4 vermittelte Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen induziert wird. Die Zugabe von Antikörpern gegen die β 1-Untereinheit (CD 29) und die α 4-Untereinheit (CD 49d) des VLA-4 Rezeptors auf Monozyten bewirkte eine ebenso deutliche Reduktion der IL-1 β Freisetzung in Monozyten wie der endothelialen IL-6 Produktion. Dies macht deutlich, daß die Monozytenaktivierung mit nachfolgender IL-1 β Freisetzung über eine adhäsionsbedingte Aktivierung des β 1-Integrins und nicht des β 2-Integrins zustande kommt. In der Literatur ist beschrieben, daß beide Integrine nach Adhäsion Signale in die Zelle transduzieren können (Hynes et al 1992) und

damit zur vermehrten Genexpression von Entzündungsmediatoren beitragen (Haskill et al 1988, Eierman et al 1989, Yurochko et al 1992, Lukacs et al 1994, Lukacs et al 1995). Yurochko et al (1992) zeigte jedoch bereits, daß stimulierende Antikörper gegen β 1-Integrine zu einer IL-1 β Freisetzung in Monozyten führten, nicht jedoch Antikörper gegen β 2-Integrine. Dabei hatten Antikörper gegen die α 4-Untereinheit und die β 1-Untereinheit den gleichen Effekt. Zusätzlich vermittelt VLA-4 nicht nur die Induktion von IL-1 β und TNF α , sondern stimuliert auch die prokoagulatorische Aktivität mittels Produktion von tissue factor (Fan et al 1995). In neueren Untersuchungen fand man, daß über Phosphorylierung von Tyrosinresten MAP-Kinasen aktiviert werden und daß zusätzlich NF- κ B zum Zellkern transloziert und eine Geninduktion bewirkt (McGilvray et al 1997). Jedoch ist in allen diesen Versuchen die adhäsionsbedingte Aktivierung des VLA-4 Rezeptors nur durch "crosslinking" mittels monoklonaler Antikörper herbeigeführt worden (McGilvray et al 1997) und nicht im direkten Zell-Zell-Kontakt. Mit unseren Ergebnissen konnte an einem physiologischen Modell der Zell-Zell-Interaktion verifiziert werden, daß eine via β 1-Integrine vermittelte Adhäsion von Monozyten an aktivierte Endothelzellen eine Zytokininduktion in beiden Zellen zur Folge hat. Die Bindung über VLA-4 an VCAM-1 auf voraktivierten Endothelzellen induziert in Monozyten die Produktion von IL-1 β . IL-1 β stimuliert dann die Endothelzellen zur Produktion von IL-6. Mit Hilfe der Durchflußzytometrie konnte festgestellt werden, daß die Inkubation von voraktiviertem Endothel mit Monozyten zu einer signifikant erhöhten Expression von VCAM-1 auf Endothelzellen führte. Wie jedoch auch unsere Messungen zeigten, führt IFN γ alleine zu keiner nennenswerten Steigerung der VCAM-1-Expression (Dustin et al 1986, Pober et al 1986). Antikörper gegen VCAM-1 und der IL-1 Rezeptorantagonist inhibierten die VCAM-1 Expression auf Endothelzellen. Das bedeutet, daß die β 1-Integrin vermittelte IL-1 β Freisetzung in Monozyten die VCAM-Expression auf Endothelzellen induziert und somit weitere Monozyten über VLA-4 an Endothelzellen binden. Es resultiert ein positiver Rückkopplungsmechanismus. Mehrere Arbeiten zeigen, daß die Sekretion von Entzündungsmediatoren auch

über andere Adhäsionsmoleküle induziert werden kann. So kommt es durch eine monozytäre-endotheliale Interaktion über ICAM-1 zu einer Sekretion des Chemokins MIP-1 α (Lukacs et al 1994). Marx et al (1998) konnten zeigen, daß in Monozyten, die über ICAM-1 an glatte Muskelzellen binden, vermehrt tissue factor exprimiert wird. Dadurch wird die prokoagulatorische Aktivität im Bereich des arteriosklerotischen Plaques gefördert und trägt auf diese Weise zur Thrombose nach Plaqueruptur bei. Die Adhäsion von Monozyten an unstimuliertes Endothel ist vor allem β 2-Integrin abhängig (Wallis et al 1985, Carlos et al 1991). Die verstärkte monozytäre Adhärenz an zytokinaktiviertes Endothel kann jedoch nur durch eine Kombination von Antikörpern gegen VLA-4, CD18 und ELAM-1 blockiert werden (Hakkert et al 1991, Carlos et al 1991). Auch die anschließende Migration der Monozyten durch das aktivierte Endothel ist nur durch eine Kombination von CD18- und VLA-4-Antikörper hemmbar (Meerschaert et al 1995).

Anhand des Zellmodells in dieser Arbeit kann nicht erklärt werden, wie es zu der schwachen Expression von IL-1 β und IL-6 nach Adhäsion von Monozyten an nicht-aktiviertes Endothel kommt. In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, daß PDGF durch Interaktion von unstimuliertem Endothel mit Monozyten induziert wird (Funayama et al 1998). In unseren Versuchen entspricht die freigesetzte Menge an IL-1 β und IL-6 in der Kokultivierung mit unstimuliertem Endothel in etwa der Menge aus den Versuchen mit den Transwell-Kammern. Es liegt die Vermutung nahe, daß bis jetzt unbekannte, lösliche Faktoren an der basalen Interleukinexpression beteiligt sind.

4.4 NF- κ B Aktivierung als adhäsionsbedingter Prozeß

Die präsentierten Daten zeigen, daß nach einer einstündigen Inkubation von Monozyten mit ruhendem und mit IFN γ -stimuliertem Endothel in beiden Zelltypen der Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert wurde. Sowohl Monozyten alleine als auch nicht-aktiviertes und voraktiviertes Endothel zeigten keine Aktivierung von NF- κ B. Wenn Monozyten mit Endothelzellen inkubiert werden,

kommt es zu einer nukleären Translokation von NF- κ B in beiden Zellarten. Die NF- κ B Aktivierung ist stärker in Monozyten, die mit voraktiviertem Endothel inkubiert waren als in Monozyten mit ruhendem Endothel. Es ist bekannt, daß die Induktion von IL-1 β über die Aktivierung von NF- κ B reguliert wird (Baeuerle et al 1994, Hiscott et al 1993). Hiscott et al (1993) konnten im IL-1 β Promoter eine Bindungsstelle für NF- κ B nachweisen. Zudem konnte kürzlich an einer Monozytenzelllinie gezeigt werden, daß die Aktivierung des VLA-4-Rezeptors eine Translokation von NF- κ B zum Zellkern zur Folge hat (McGilvray et al 1997). Andere Arbeitsgruppen konnten nachweisen, daß IL-1 in Zielzellen die nukleäre Translokation von NF- κ B induzieren kann (Lenardo et al 1989, Hiscott et al 1993, Baeuerle et al 1994). Aufgrund dieser Ergebnisse könnte argumentiert werden, daß bereits sehr geringe Mengen an IL-1 β zu einem frühen Zeitpunkt der Kokultivierung die eigene monozytäre IL-1 β Produktion über NF- κ B hochregulieren und in Endothelzellen NF- κ B aktivieren. Dieser mögliche autoregulatorische Effekt konnte durch Kokultivierungsversuche mit dem IL-1 RA ausgeschlossen werden, da die IL-1 β Synthese dadurch nicht inhibiert wurde. Endotheliales VCAM-1 wird NF- κ B-abhängig induziert (Baeuerle et al 1994, Collins et al 1995), wobei im VCAM-1 Promoter zwei NF- κ B Bindungsstellen lokalisiert sind, die durch Zytokine aktiviert werden können (Iademarco et al 1992, Neish et al 1992). Man weiß, daß ein stereospezifischer Komplex von verschiedenen Transkriptionsfaktoren an der maximalen Expression von VCAM-1 nach Stimulation beteiligt ist, der einzigartig für dieses Gen die Regulation kontrolliert (Collins et al 1995). Diese Einzigartigkeit in der Zusammensetzung gewährleistet eine Spezifität in der Induktion verschiedener Gene und erklärt beispielsweise die unterschiedlichen NF- κ B-abhängigen Expressionsmuster von E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 auf Endothelzellen. Die Zusammensetzung des sog. Transkriptionsfaktorkomplexes könnte ein Grund für das bereits erwähnte Phänomen sein, daß in unseren Versuchen Monozyten nach Adhäsion vor allem IL-1 β und Endothelzellen IL-6 und VCAM-1, aber kaum IL-1 β freisetzen. Versuche mit Antioxidantien zum Beispiel ergaben, daß die VCAM-1 und E-

Selektin Expression nach Stimulation durch IL-1 β und TNF α fast völlig inhibiert werden konnte und die Aktivierung von NF- κ B blockiert wurde, die Induktion von ICAM-1 aber unverändert blieb (Marui et al 1993, Erl et al 1997).

An das neu synthetisierte und exprimierte VCAM-1 können nun weitere Monozyten über VLA-4 binden. Diese Interaktion bewirkt eine erneute Aktivierung von NF- κ B in Monozyten und in Endothelzellen. Die in dieser Arbeit untersuchten zellulären Interaktionen und die Aktivierung von NF- κ B könnten eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie von Entzündungsvorgängen spielen wie sie beispielsweise in der Arteriosklerose vorkommen.

4.5 Endotheliale IL-6 Freisetzung in Patienten mit akutem Myokardinfarkt

Um die klinische Relevanz unserer Ergebnisse zu unterstreichen, haben wir nicht-aktiviertes Endothel mit Infarktplasmen inkubiert und auf IL-6 Freisetzung untersucht. Wir konnten zeigen, daß die Infarktplasmen die IL-6 Expression in Endothelzellen signifikant erhöhen. Die Plasmen von Infarktpatienten, die am zweiten Tag nach Reperfusion eines akuten Myokardinfarkts abgenommen wurden, zeigten bereits erhöhte Konzentrationen an IL-6 im Vergleich zu den Kontrollplasmen, die von Patienten mit elektiver PTCA gewonnen wurden. Das steht in Einklang mit Ergebnissen früherer Studien, die erhöhte Spiegel an IL-6 im akuten Myokardinfarkt nachweisen konnten (Miyao et al 1993, Neumann et al 1995, Seino et al 1995).

Die IL-6 Freisetzung konnte durch den IL-1 Rezeptorantagonisten signifikant gehemmt werden, was die Anwesenheit von IL-1 β im Plasma nahelegt. Auch Guillen et al (1995) beschrieb ein sequentielles Auftreten von IL-1 β und IL-6 im Plasma von Infarktpatienten und konnte in Endothelzellen und Fibroblasten mit Infarktplasmen eine IL-6 Synthese induzieren. Allerdings konnten wir weder in den Plasmen noch in den Inkubationsüberständen IL-1 β nachweisen. Das wird durch frühere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe bestätigt: Neumann et al (1995) fand im akuten Myokardinfarkt eine erhöhte Freisetzung von IL-6 und IL-8, aber

nicht von IL-1. Unsere jetzigen Versuche am Modell der Zell-Zell-Interaktion legen nahe, daß es zu einer Freisetzung von IL-1 β kommt, welches in den Blutkreislauf gelangen könnte. Obwohl wir im ELISA keine erhöhten Werte für IL-1 β finden, muß das nicht unsere Hypothese widerlegen. Zum einen reichen bereits Konzentrationen von IL-1 β unterhalb der Nachweisgrenze des ELISA aus, um den gewünschten Effekt zu erreichen und zum anderen ist anzunehmen, daß Monozyten im Infarktgebiet IL-1 β freisetzen, das parakrin Endothelzellen zur IL-6 Produktion anregt.

Durch den IL-1 Rezeptorantagonisten konnte die IL-6 Produktion nicht vollständig inhibiert werden. Es könnten außer IL-1 noch weitere, bis jetzt nicht identifizierte lösliche Faktoren im Infarktplasma an der IL-6 Freisetzung beteiligt sein.

Die Stimulation der endothelialen IL-6 Synthese durch IL-1 könnte einen wichtigen Mechanismus repräsentieren, mit dem der systemische Anstieg von IL-6 im akuten Myokardinfarkt erklärt werden kann.

4.6 Klinische und therapeutische Ausblicke

Die zellulären Mechanismen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, könnten eine wichtige Rolle bei der Regulation von lokalen und systemischen Entzündungsvorgängen in der Arteriosklerose und im akuten Myokardinfarkt spielen. Wenn Monozyten an voraktiviertes Endothel im Entzündungsgebiet adhären, kommt es durch die Interaktion von VLA-4 und VCAM-1 zu einer NF- κ B Aktivierung und zur Freisetzung von IL-1 β in Monozyten. Dieses IL-1 β stimuliert nun wiederum die Endothelzellen zur Produktion von IL-6 und zu einer vermehrten VCAM-1 Expression. Dadurch kommt es zu einer weiteren Adhäsion von Monozyten an das Endothel.

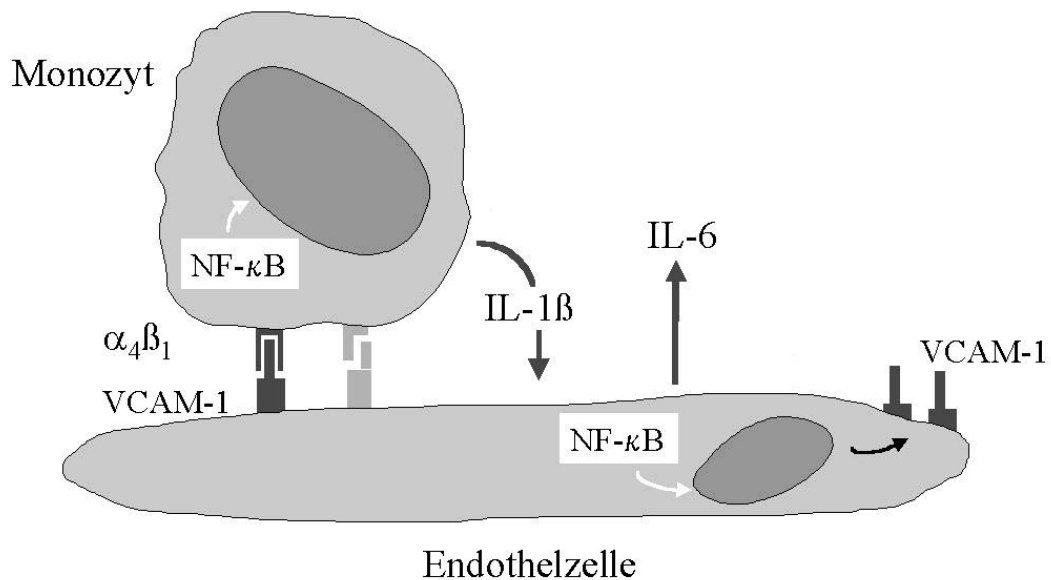


Abb.10: Schematische Darstellung der Zellinteraktion zwischen monozytärem VLA-4 und endotheliale VCAM-1 und der daraus resultierenden Zellaktivierung und Zytokinexpression.

Dieser Mechanismus könnte eines der frühesten Ereignisse in der Entzündungskaskade der Arteriosklerose und des reperfundierten Myokards darstellen. Anhand dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Interaktion von VLA-4 und VCAM-1 durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B eine IL-1 β -abhängige lokale Entzündungsantwort induziert. Zum einen wird dadurch das Fortschreiten der Arteriogenese und der Zellschädigung im akuten Myokardinfarkt unterhalten und zum anderen kommt es zu einer IL-6 abhängigen systemischen Entzündungsantwort. Die klinische Relevanz unserer Ergebnisse wird deutlich an Versuchen von Morishita et al (1997). Es konnte nachgewiesen

werden, daß doppelsträngige “decoy” Oligodeoxynukleotide, die den aktivierten Transkriptionsfaktor NF- κ B binden und die NF- κ B abhängige Transkription hemmen, zu einer erheblichen Reduktion des ischämischen Myokardschadens führen. Durch die Transfektion der Oligodeoxynukleotide in Rattenherzen während der frühen Reperfusion konnte nicht nur das Ausmaß des Myokardschadens begrenzt werden, sondern auch eine erhebliche Abnahme der IL-6 und VCAM-1 mRNA nachgewiesen werden. Ferner war die Reduktion von IL-6 und VCAM-1 mit einer verminderten Anzahl von infiltrierenden Leukozyten assoziiert. Aus diesen Ergebnissen wurde gefolgert, daß NF- κ B ganz entscheidend das Ausmaß der Myokardschädigung nach Reperfusion bestimmt. NF- κ B könnte eine pathophysiologische Schlüsselrolle bei Entzündungsvorgängen in der Pathogenese der Arteriosklerose und im akuten Myokardinfarkt spielen. Aufgrund seiner regulatorischen Funktion stellt das NF- κ B-System einen geeigneten Ansatz für die Entwicklung spezifischer, antiinflammatorischer Therapeutika dar. Für bereits etablierte entzündungshemmende Substanzen wie Acetylsalicylsäure wurde gezeigt, daß sie neben zahlreichen anderen Effekten in der Lage sind, die Aktivierung von NF- κ B zu verhindern (Baeuerle et al 1997, Beauparlant et al 1996) und auf Endothelzellen die Expression von Adhäsionsmolekülen zu vermindern (Pierce et al 1996). Mit Hilfe von Antioxidantien konnte bereits in vitro eine NF- κ B-abhängige VCAM-Expression inhibiert werden (Marui et al 1993, Erl et al 1997). Ebenso könnten möglicherweise spezifischere Inhibitoren des Proteasoms den Aktivierungsprozeß dieses Transkriptionsfaktors modulieren (Cobb et al 1996, Haas et al 1998). In jedem Fall muß bedacht werden, daß die Hemmung des NF- κ B-Systems mit einer Suppression immunregulatorischer Vorgänge verbunden ist bzw. eine erhöhte Sensitivität der Zellen gegenüber Apoptose nach sich ziehen könnte (Baeuerle et al 1997). Das immer tiefer gehende molekulare Verständnis des NF- κ B-Systems sollte zu einer Entwicklung spezifischer Substanzen führen, die gezielt verschiedene regulatorische Schritte dieses transkriptionellen Systems partiell und reversibel hemmen, um bei Entzündungsprozessen zu intervenieren.

Auch VLA-4, VCAM-1 und IL-1 β stellen therapeutische Optionen zur pharmakologischen Intervention dar, weil mit deren Hemmung frühzeitig in die Entzündungskaskade des akuten Myokardinfarkts eingegriffen werden könnte, bevor der schädigende Prozeß in Gang gekommen ist.

5 Zusammenfassung

Inflammatorische Prozesse tragen wesentlich zum klinischen Verlauf akuter Koronarsyndrome bei. Bereits die Arteriosklerose als zugrundeliegende Gefäßveränderung führt zu einer lokalen Entzündungsreaktion, welche eine systemische Entzündungsantwort induziert. Das Ausmaß der systemischen Entzündungsreaktion korreliert mit dem Risiko akuter Koronarsyndrome. Das Zytokin Interleukin-6 spielt durch die hepatische Induktion von Akut-Phase-Proteinen wie CRP eine entscheidende Rolle als Mediator zwischen lokalen und systemischen Entzündungsreaktionen und stellt einen unabhängigen prognostischen Marker für den klinischen Verlauf akuter Koronarsyndrome dar. In atheromatösen Plaques kommt es als lokale entzündliche Reaktion zur Freisetzung von Interferon γ aus T-Lymphozyten, das Endothelzellen aktiviert und Monozyten in das Entzündungsgebiet lenkt.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die Interaktion zwischen Endothelzellen und Monozyten zur Expression von IL-6 und IL-1 β führt, welche Adhäsionsmoleküle daran beteiligt sind und inwieweit der Transkriptionsfaktor NF- κ B die Genexpression reguliert.

Die Kokultivierung von IFN γ -stimulierten Endothelzellen und Monozyten führt auf Protein-Ebene zu einer Freisetzung von IL-1 β und IL-6. Anhand der mRNA-Analyse für jeden Zelltyp getrennt konnte nachgewiesen werden, daß Monozyten vor allem IL-1 β synthetisieren, während Endothelzellen die Hauptproduzenten von IL-6 sind. Dabei wird endotheliales IL-6 abhängig von IL-1 β freigesetzt, da die IL-6 Synthese durch einen IL-1-Rezeptorantagonisten gehemmt werden kann. Versuche mit inhibierenden Antikörpern ergaben, daß die Bindung von monozytärem VLA-4 an endotheliales VCAM-1 verantwortlich für die Induktion von IL-1 β in Monozyten ist. Es ist bekannt, daß NF- κ B eine Schaltstelle in der

Genexpression proinflammatorischer Zytokine ist. Die Inkubation von Monozyten mit Endothelzellen aktiviert in beiden Zelltypen den Transkriptionsfaktor NF- κ B.

Diese Ergebnisse zeigen, daß bereits die Zell-Zell-Interaktion über Adhäsionsmoleküle die nukleäre Translokation von NF- κ B induziert.

Die Bindung von Monozyten über VLA-4 an endotheliales VCAM-1 aktiviert den Transkriptionsfaktor NF- κ B in beiden Zelltypen, Monozyten synthetisieren IL-1 β , welches wiederum die Freisetzung von IL-6 in Endothelzellen fördert.

Dieser Mechanismus der β 1-Integrin-vermittelten Expression von IL-1 β und IL-6 könnte eine entscheidende Rolle in der Entstehung systemischer Entzündungsreaktionen bei akuten Koronarsyndromen spielen.

6 Literaturverzeichnis

Akira S., Hirano T., Taga T., and Kishimoto T.

Biology of multifunctional cytokines: IL-6 and related molecules (IL-1 and TNF)

FASEB 4 (1990) 2860-2867

Baeuerle P.A. and Baltimore D.

I κ B: A specific inhibitor of the NF- κ B transcription factor

Science 242 (1988) 540-546

Baeuerle P.A.

The inducible transcription activator NF- κ B: regulation by distinct protein subunits

Biochimica et Biophysica Acta 1072 (1991) 63-80

Baeuerle P.A. and Henkel T.

Function and activation of NF- κ B in the immune system

Annu Rev Immunol 12 (1994) 141-179

Baeuerle P.A., Baichwal V.R.

NF- κ B as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules

Adv Immunol 65 (1997) 111-137

Baldwin A.S.

The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights

Annu Rev Immunol 14 (1996) 649-83

Beauparlant P., Hiscott J.

Biological and biochemical inhibitors of the NF- κ B/rel proteins and cytokine synthesis

Cytokine and Growth Factor Reviews 7 (1996) 175-189

Berk B.C., Weintraub W.S., Alexander R.W.

Elevation of C-reactive protein in 'active' coronary artery disease

Am J Cardiol 65 (1990) 168-172

Bevilacqua M.P., Pober J.S., Wheeler M.E., Cotran R.S., and Gimbrone M.A.

Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines

J Clin Invest 76 (1985) 2003-2011

Biasucci L.M., Vitelli A., Liuzzo G., Altamura S., Caligiuri G., Monaco C., Rebuzzi A.G., Ciliberto G., Maseri A.

Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina

Circulation 94 (1996) 874-877

Bohle R.M., Pich S. and Klein H.H.

Modulation of the inflammatory response in experimental myocardial infarction

Eur Heart J 12 (1991) 28-31

Brand K., Page S., Rogler G., Bartsch A., Brandl R., Knuechel R., Page M., Kaltschmidt C., Baeuerle P.A., Neumeier D.

Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion

J Clin Invest 97 (1996) 1715-1722

Brand K., Page S., Walli A.K., Neumeier D. Baeuerle P.A.

Role of nuclear factor κ B in atherogenesis

Exp Physiol 82 (1997) 297-304

Braunwald E, Kloner R.A.

The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction

Circulation 66 (1982) 1146-1149

Butcher E.C.

Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity

Cell 67 (1991) 1033-1036

Carlos T.M., Schwartz B.R., Kovach N.L., Yee E., Rosso M., Osborn L., Chi-Rosso G., Newman B., Lobb R., and Harlan J.M.

Vascular cell adhesion molecule-1 mediates lymphocyte adherence to cytokine-activated cultured

human endothelial cells

Blood 76 (1990) 965-970

Carlos T.M., Kovach N.L., Schwartz B.R., Rosa M., Newman B., Wayner E., Benjamin C., Osborn L., Lobb R., and Harlan J.M.

Human monocytes bind to two cytokine-induced adhesive ligands on cultured human endothelial cells: Endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1

Blood 77 (1991) 2266-2271

Cobb R.R., Felts K.A., Parry G.C.N., and Mackman N.
Proteasome inhibitors block VCAM-1 and ICAM-1 gene expression in endothelial cells without affecting nuclear translocation of nuclear factor- κ B
Eur J Immunol 26 (1996) 839-845

Cole D.R., Singian E.B., Kate L.N.
The long-term prognosis following myocardial infarction and some factors which affect it
Circulation 9 (1954) 321-334

Collins T.
Endothelial nuclear factor- κ B and the initiation of the atherosclerotic lesion
Lab Invest 68 (1993) 499-508

Collins T., Palmer H.J., Whitley M.Z., Neish A.S., and Williams A.J.
A common theme in endothelial activation-insights from the structural analysis of the genes for E-selectin and VCAM-1
Trends Cardiovasc Med 3 (1993) 92-97

Collins T., Read M.A., Neish A.S., Whitley M.Z., Thanos D., Maniatis T.
Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF- κ B and cytokine-inducible enhancers
FASEB 9 (1995) 899-909

Cybulsky M.I., Gimbrone M.A. Jr.
Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis
Science 251 (1991) 788-791

Darnell J.E., Kerr I.M., Stark G.R.

Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins

Science 264 (1994) 1415-1421

Davies M.J., Gordon J.L., Gearing A.J.H., Pigott R., Woolf N., Katz D., and Kyriakopoulos A.

The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-Selectin in human atherosclerosis

J Pathol 171 (1993) 223-229

Dinarello C.A., and Mier J.W.

Current concepts: Lymphokines

N Engl J Med 317 (1987) 940-945

Dinarello C.A.

The biology of interleukin-1

In: Interleukins: Molecular Biology and Immunology

Chem Immunol Basel, Karger, 51 (1992) 1-32

Durum S.K., Schmidt J.A., and Oppenheim J.J.

Interleukin 1: an immunological perspective

Ann Rev Immunol 3 (1985) 263-87

Dustin M.L., Rothlein R., Bhan A.K., Dinarello C.A., and Springer T.A.

Induction by Il 1 and interferon- γ : Tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1)

J Immunol 137 (1986) 245-254

Eierman D.F., Johnson C.E., and Haskill J.S.

Human monocyte inflammatory mediator gene expression is selectively regulated by adherence substrates

J Immunol 142 (1989) 1970-1976

Elices M.J., Osborn L., Takada Y., Crouse C., Luhowskyj S., Hemler M.E., and Lobb R.R.

VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct

from the VLA-4/fibronectin binding site

Cell 60 (1990) 577-584

Engler R.L., Dahlgren M.D., Morris D.D., Peterson M.A., and Schmid-Schönbein G.W.

Role of leukocytes in response to acute myocardial ischemia and reflow in dogs

Am J Physiol 251 (1986) H314-H322

Entman M.L., Michael L., Rossen R.D., Dreyer W.J., Anderson D.C., Taylor A.A., and Smith C.W.

Inflammation in the course of early myocardial ischemia

FASEB 5 (1991) 2529-2537

Entman M.L. and Smith C.W.

Postreperfusion inflammation: a model for reaction to injury in cardiovascular disease

Cardiovasc Res 28 (1994) 1301-1311

Erl W., Weber C., Wardemann C., and Weber P.C.

α -tocopheryl succinate inhibits monocytic cell adhesion to endothelial cells by suppressing NF- κ B mobilization

Am J Physiol 273 (1997) H634-H640

Fan S.-T., Mackman N., Cui M.-Z., and Edgington T.S.

Integrin regulation of an inflammatory effector gene

Direct induction of the tissue factor promoter by engagement of β 1 or α 4 integrin chains

J Immunol 154 (1995) 3266-3274

Friedman G.D., Klatsky A.L., and Siegelau A.B.

The leukocyte count as a predictor of myocardial infarction

N Engl J Med 290 (1974) 1275-1278

Fries J.W.U., Williams A.J., Atkins R.C., Newman W., Lipscomb M.F. and Collins T.

Expression of VCAM-1 and E-Selectin in an *in Vivo* Model of Endothelial Activation

Am J Pathol 143 (1993) 725-737

Funayama H., Ikeda U., Takahashi M., Sakata Y., Kitagawa S.-I., Takahashi Y.-I., Masuyama J.-I., Furukawa Y., Miura Y., Kano S., Matsuda M., Shimada K.

Human monocyte-endothelial cell interaction induces platelet-derived growth factor expression

Cardiovasc Res 37 (1998) 216-224

Gerrity R.G.

The role of the monocyte in atherogenesis

Am J Pathol 103 (1981) 181-200

Gosh S. and Baltimore D.

Activation in vitro of NF- κ B by phosphorylation of its inhibitor I κ B

Nature 344 (1990) 678-682

Gown A.M., Tsukada T., Ross R.

Human Atherosclerosis

II. Immunocytochemical Analysis of the Cellular Composition of Human

Atherosclerotic Lesions

Am J Pathol 125 (1986) 191-207

Grilli M., Chiu J. J.-S., and Lenardo M.J.

NF- κ B and Rel: participants in a multifunctional transcriptional regulatory system

Int Rev Cytol 143 (1993) 1-62

Guillen I., Blanes M., Gomez-Lechon M.J., and Castell Jose

Cytokine signaling during myocardial infarction: sequential appearance of IL-1 β and IL-6

Am J Physiol (1995) R229-R235

Gwechenberger M., Mendoza L.H., Youker K.A., Frangogiannis N.G., Smith

C.W., Michael L.H., Entman M.L.

Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions

Circulation 99 (1999) 546-551

Haas M., Page S., Page M., Neumann F.-J., Marx N., Adam M., Löms Ziegler-Heitbrock H.W., Neumeier D., and Brand K.

Effect of proteasome inhibitors on monocytic I κ B- α and - β depletion, NF- κ B activation, and cytokine production

J Leukoc Biol 63 (1998) 395-404

Hakkert B.C., Kuijpers T.W., Leeuwenberg J.F.M., van Mourik J.A., and Roos D.
Neutrophil and monocyte adherence to and migration across monolayers of cytokine-activated endothelial cells: The contribution of CD18, ELAM-1, and VLA-4

Blood 78 (1991) 2721-2726

Harlan J.M.

Leukocyte-endothelial interactions

Blood 65 (1985) 513-525

Harlan J.M.

Consequences of leukocyte-vessel wall interactions in inflammatory and immune reactions

Seminars in Thrombosis and Hemostasis 13 (1987) 434-444

Haskill S., Johnson C., Eierman D., Becker S., and Warren K.

Adherence induces selective mRNA expression of monocyte mediators and proto-oncogenes

J Immunol 140 (1988) 1690-1694

Hawrylowicz C.M., Howells G.L., Feldmann M.

Platelet-derived interleukin 1 induces human endothelial adhesion molecule expression and cytokine production

J Exp Med 174 (1991) 785-790

Hearse D.J., Bolli R.

Reperfusion induced injury: manifestations, mechanisms, and clinical relevance
Cardiovasc Res 26 (1992) 101-108

Hearse D.J., Maxwell L., Saldanha C., Gavin J.B.

The myocardial vasculature during ischemia and reperfusion: a target for injury
and protection
J Mol Cell Cardiol 25 (1993) 759-800

Heinrich P.C., Castell J.V., Andus T.

Interleukin-6 and the acute phase response
Biochem J 265 (1990) 621-636

Hemler M.E.

VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on
leukocytes
Annu Rev Immunol 8 (1990) 365-400

Hiscott J., Marois J., Garoufalos J., D'Addario M., Roulston A., Kwan I., Pepin N.,
Lacoste J., Nguyen H., Bensi G., and Fenton M.

Characterization of a functional NF- κ B site in the human interleukin 1 β promoter:
evidence for a positive autoregulatory loop
Mol Cell Biol 13 (1993) 6231-6240

Hynes R.O.

Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion
Cell 69 (1992) 11-25

Iademarco M.F., McQuillan J.J., Rosen G.D., and Dean D.C.
Characterization of the promoter for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)
J Biol Chem 267 (1992) 16323-16329

Ikebuchi K., Wong G.C., Clark S.C., Ihle J., Hirai Y., Ogawa M.
Interleukin-6 enhancement of interleukin-3-dependent proliferation of
multifunctional hemopoietic progenitors
Proc Natl Acad Sci 84 (1987) 9035-9039

Ikeda U., Ikeda M., Seino Y., Takahashi M., Kano S., Shimada K.
Interleukin 6 gene transcripts are expressed in atherosclerotic lesions of
genetically hyperlipidemic rabbits
Atherosclerosis 92 (1992) 213-218

Ikeda U., Ohkawa F., Seino Y., Yamamoto K., Hidaka Y., Kasahara T., Kawai T.,
Shimada K.
Serum interleukin 6 levels become elevated in acute myocardial infarction
J Mol Cell Cardiol 24 (1992) 579-584

Ishibashi T., Kimura H., Uchida T., Kariyone S., Friese P., Burstein S.A.
Human interleukin-6 is a direct promoter of maturation of megakaryocytes in vitro
Proc Natl Acad Sci 86 (1989) 5953-5957

Issekutz T.B., Issekutz A.C., and Movat H.Z.
The in vivo quantitation and kinetics of monocyte migration into acute
inflammatory tissue
Am J Pathol 103 (1981) 47-55

Isshiki H., Akira S., Tanabe O., Nakajima T., Shimamoto T., Hirano T., and Kishimoto T.

Constitutive and interleukin-1 (IL-1)-inducible factors interact with the IL-1-responsive element in the IL-6 gene
Mol Cell Biol 10 (1990) 2757-2764

Jaffe E.A., Nachman R.L., Becker C.G., and Minick C.R.

Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins
J Clin Invest 52 (1973) 2745-2756

Jang Y., Lincoff A.M., Plow E.F., Topol E.J.

Cell Adhesion Molecules in Coronary Artery Disease
JACC 24 (1994) 1591-1601

Johnston R.B.

Monocytes And Macrophages
N Engl J Med 318 (1988) 747-752

Khan B.V., Parthasarathy S.S., Alexander R.W., Medford R.M.

Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells
J Clin Invest 95 (1995) 1262-1270

Kharazmi A., Nielsen H., Rechnitzer C., Bendtzen K.

Interleukin-6 primes human neutrophil and monocyte oxidative burst response
Immunol Lett 21 (1989) 177-184

Kishikawa H., Shimokama T., Watanabe T.

Localisation of T lymphocytes and macrophages expressing IL-1, IL-2 receptor, IL-6 and TNF in human aortic intima: role of cell-mediated immunity in human atherogenesis

Virchows Arch 423 (1993) 433-442

Kishimoto T.

The biology of interleukin-6

Blood 74 (1989) 1-10

Kloner R.A.

Does reperfusion injury exist in humans?

JACC 21 (1993) 537-45

Kukielka G.L., Hawkins H.K., Michael L., Manning A.M., Youker K., Lane C., Entman M.L., Smith C.W., and Anderson D.C.

Regulation of Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) in Ischemic and Reperfused Canine Myocardium

J Clin Invest 92 (1993) 1504-1516

Kukielka G.L., Smith C.W., Manning A.M., Youker K.A., Michael L.H., Entman M.L.

Induction of interleukin-6 synthesis in the myocardium

Circulation 92 (1995) 1866-1875

Kukielka G.L., Youker K.A., Michael L.H., Kumar A.G., Ballantyne C.M., Smith C.W., and Entman M.L.

Role of early reperfusion in the induction of adhesion molecules and cytokines in previously ischemic myocardium

Mol Cell Biochem 147 (1995) 5-12

Le J. and Vilcek J.

Tumor necrosis factor and interleukin 1: cytokines with multiple overlapping biological activities

Lab Invest 56 (1987) 234-245

Le J. and Vilcek J.

Interleukin 6: a multifunctional cytokine regulating immune reactions and the acute phase protein response

Lab Invest 61 (1989) 588-602

Leeuwenberg J.F.M., von Asmuth E.J.U., Jeunhomme T.M.A.A., and Buurman W.A.

IFN- γ regulates the expression of the adhesion molecule ELAM-1 and IL-6 production by human endothelial cells in vitro

J Immunol 145 (1990) 2110-2114

Lenardo M.J. and Baltimore D.

NF- κ B: a pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control

Cell 58 (1989) 227-229

Libermann T.A. and Baltimore D.

Activation of interleukin-6 gene expression through the NF- κ B transcription factor

Mol Cell Biol 10 (1990) 2327-2334

Libby P., Ordovas J.M., Auger K.R., Robbins A.H., Birinyi L.K., and Dinarello C.A.

Endotoxin and tumor necrosis factor induce interleukin-1 gene expression in adult human vascular endothelial cells

Am J Pathol 124 (1986) 179-185

Libby P. and Hansson G.K.

Involvement of the Immune System in Human Atherogenesis:
Current Knowledge and Unanswered Questions

Lab Invest 64 (1991) 5-15

Liuzzo G., Biasucci L.M., Gallimore J.R., Grillo R.L., Rebuffi A.G., Pepys M.B.,
and Maseri A.

The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe
unstable angina

N Engl J Med 331 (1994) 417-424

Lowe G.D.O., Machado S.G., Krol W.F., Barton B.A., and Fobres C.D.

White blood cell count and hematocrit as predictors of coronary recurrence after
myocardial infarction

Thromb Haemost 54 (1985) 700-703

Lukacs N.W., Strieter R.M., Elner V.M., Evanoff H.L., Burdick M., and Kunkel
S.L.

Intercellular adhesion molecule-1 mediates the expression of monocyte-derived
MIP-1 α during monocyte-endothelial cell interactions

Blood 83 (1994) 1174-1178

Lukacs N.W., Strieter R.M., Elner V., Evanoff H.L., Burdick M.D., and Kunkel
S.L.

Production of chemokines, interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1
during monocyte:endothelial cell interactions

Blood 86 (1995) 2767-2773

Ma X.-L., Tsao P.S., Lefler A.M.

Antibody to CD-18 exerts endothelial and cardiac protective effects in myocardial ischemia and reperfusion

J Clin Invest 88 (1991) 1237-1243

Mackman N., Brand K., and Edgington T.S.

Lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the human tissue factor gene in THP-1 monocytic cells requires both activator protein 1 and nuclear factor κ B binding sites

J Exp Med 174 (1991) 1517-1526

Mallory G.K., White P.D., Salcedo-Salgar J.

The speed of healing of myocardial infarction. A study of the pathologic anatomy in seventy-two cases

Am Heart J 18 (1939) 647-671

Mantovani A., Bussolino F., Dejana E.

Cytokine regulation of endothelial cell function

FASEB 6 (1992) 2591-2599

Marui N., Offermann M.K., Swerlick R., Kunsch C., Rosen C.A., Ahmad M., Alexander R.W., and Medford R.M.

Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells

J Clin Invest 92 (1993) 1866-1874

Maruo N., Morita I., Shirao M., Murota S.-I.

IL-6 increases endothelial permeability *in vitro*

Endocrinology 131 (1992) 710-714

Marx N., Neumann F.J., Ott I., Gawaz M., Koch W., Pinkau T. and Schömig A.
Induction of Cytokine Expression in Leucocytes in Acute Myocardial Infarction
J Am Coll Cardiol 30 (1997) 165-170

Marx N., Neumann F.-J., Zohlhörer D., Dickfeld T., Fischer A., Heimerl S.,
Schömig A.
Enhancement of monocyte procoagulant activity by adhesion on vascular smooth
muscle cells and intercellular adhesion molecule-1 –transfected chinese hamster
ovary cells
Circulation 98 (1998) 906-911

McGilvray I.D., Lu Z., Bitar R., Dackiw A.P.B., Davreux C.J., and Rotstein O.D.
VLA-4 integrin cross-linking on human monocytic THP-1 cells induces tissue
factor expression by a mechanism involving mitogen-activated protein kinase
J Biol Chem 272 (1997) 10287-10294

Meerschaert J.A., Furie M.B.
The adhesion molecules used by monocytes for migration across endothelium
include CD11a/CD18, CD11b/CD18, and VLA-4 on monocytes and ICAM-1,
VCAM-1, and other ligands on endothelium
J Immunol 154 (1995) 4099-4112

Miyao Y., Yasue H., Ogawa H., Misumi I., Masuda T., Sakamoto T., and Morita
E.
Elevated plasma interleukin-6 levels in patients with acute myocardial infarction
American Heart Journal 126 (1993) 1299-1304

Morishita R., Sugimoto T., Aoki M., Kida I., Tomita N., Moriguchi A., Maeda K., Sawa Y., Kaneda Y., Higaki J. and Ogihara T.

In vivo transfection of *cis* element “decoy” against nuclear factor- κ B binding site prevents myocardial infarction

Nat Med 3 (1997) 894-899

Mullane K.M., Read N., Salmon J.A. and Moncada S.

Role of leukocytes in acute myocardial infarction in anesthetized dogs: relationship to myocardial salvage by antiinflammatory drugs

J of Pharmacol and Exp Therapeutics 228 (1983) 510-522

Munro J.M., Cotran R.S.

The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation

Lab Invest 58 (1988) 249-261

Neish A.S., Williams A.J., Palmer H.J., Whitley M.Z., and Collins T.

Functional Analysis of the Human Vascular Cell Adhesion Molecule 1 Promoter

J Exp Med 176 (1992) 1583-1593

Neumann F.J., Ott I., Gawaz M., Richardt G., Holzapfel H., Jochum M., Schömig A.

Cardiac release of cytokines and inflammatory responses in acute myocardial infarction

Circulation 92 (1995) 748-755

Neumann F.J., Marx N., Gawaz M., Brand K., Ott I., Rokitta C., Sticherling C., Meinel C., May A., Schömig A.

Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets

Circulation 95 (1997) 2387-2394

Neumann F.J., Ott I., Marx N., Luther T., Kenngott S., Gawaz M., Kotzsch M., Schömig A.

Effect of human recombinant interleukin-6 and interleukin-8 on monocyte procoagulant activity

Arterioscl Thromb Vasc Biol 17 (1997) 3399-3405

O'Brien K.D., Allen M.D., McDonald T.O., Chait A., Harlan J.M., Fishbein D., McCarty J., Ferguson M., Hudkins K., Benjamin C.D., Lobb R., and Alpers C.E.
Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques

J Clin Invest 92 (1993) 945-951

Osborn L., Hession C., Tizard R., Vassallo C., Luhowskyj S., Chi-Rosso G., and Lobb R.

Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes

Cell 59 (1989) 1203-1211

Osborn L.

Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation

Cell 62 (1990) 3-6

Peter K., Nawroth P., Conradt C., Nordt T., Weiss T., Boehme M., Wunsch A., Allenberg J., Kübler W., Bode C.

Circulating Vascular cell adhesion molecule-1 correlates with the extent of human atherosclerosis in contrast to circulating intercellular adhesion molecule-1, E-selectin, P-selectin, and thrombomodulin

Arterioscl Thromb Vasc Biol 17 (1997) 505-512

Pierce J.W., Read M.A., Ding H., Luscinskas F.W., and Collins T.

Salicylates inhibit I κ B- α phosphorylation, endothelial-leukocyte adhesion molecule expression, and neutrophil transmigration

J Immunol 156 (1996) 3961-3969

Pober J.S., Bevilacqua M.P., Mendrick D.L., Lapierre L.A., Fiers W., and Gimbrone M.A.

Two distinct monokines, interleukin-1 and tumor necrosis factor, each independently induce biosynthesis and transient expression of the same antigen on the surface of cultured human vascular endothelial cells

J Immunol 136 (1986) 1680-1687

Pober J.S., Gimbrone M.A., Lapierre L.A., Mendrick D.L., Fiers W., Rothlein R., and Springer T.A.

Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon

J Immunol 137 (1986) 1893-1896

Pober J.S. and Cotran R.S.

Cytokines and endothelial cell biology

Physiological Reviews 70 (1990) 427-451

Podor T.J., Jirik F.R., Loskutoff D.J., Carson D.A., and Lotz M.

Human endothelial cells produce IL-6

Ann NY Acad Sci (1989)

Poston R.N., Haskard D.O., Coucher J.R., Gall N.P., and Johnson-Tidey R.R.

Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1 in Atherosclerotic Plaques

Am J Pathol 140 (1992) 665-673

Read M.A., Whitley M.Z., Williams A.J., and Tucker C.

NF- κ B and I κ B: an inducible regulatory system in endothelial activation

J Exp Med 179 (1994) 503-512

Rice G.E., Munro J.M., Corless C, and Bevilacqua M.P.

Vascular and nonvascular expression of INCAM-110

Am J Pathol 138 (1991) 385-393

Riede U.-N., Müntefering H., Drexler H., Ihling Ch., Schaefer H.-E.

Kardiovaskuläres System

In: "Allgemeine und spezielle Pathologie",

Riede U.-N., Schaefer H.-E. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag,

Stuttgart-New York, 1995, 4.Auflage, 435-524

Romson J.L., Hook B.G., Kunkel S.L., Abrams G.D., Schork M.A., and Lucchesi B.R.

Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog

Circulation 67 (1983) 1016-1023

Ross R.

The pathogenesis of atherosclerosis - an update

N Engl J Med 314 (1986) 488-500

Ross R.

The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s

Nature 362 (1993) 801-809

Ross R.

Atherosclerosis - an inflammatory disease

N Engl J Med 340 (1999) 115-126

Rus H.G., Vlaicu R. and Niculescu F.

Interleukin-6 and interleukin-8 protein and gene expression in human arterial atherosclerotic wall

Atherosclerosis 127 (1996) 263-271

Seino Y., Setsuta K., Tomita Y., Nejima J., Takano T., Hayakawa H.

Increased plasma levels of interleukin-6 and myocardial stunning after coronary reperfusion therapy

Am J Cardiol 76 (1995) 718-720

Shimizu H., Mitomo K., Watanabe T., Okamoto S., Yamamoto K.-I.

Involvement of a NF- κ B-like transcription factor in the activation of the interleukin-6 gene by inflammatory lymphokines

Mol Cell Biol 10 (1990) 561-568

Sica A., Wang J.M., Colotta F., Dejana E., Mantovani A., Oppenheim J.J., Larsen C.G., Zachariae C.O.C., and Matsushima K.

Monocyte chemotactic and activating factor gene expression induced in endothelial cells by IL-1 and tumor necrosis factor

J Immunol 144 (1990) 3034-3038

Simpson P.J., Todd R.F., Mickelson J.K., Fantone J.C., Gallagher K.P., Lee K.A., Tamura Y., Cronin M., and Lucchesi B.R.

Sustained limitation of myocardial reperfusion injury by a monoclonal antibody that alters leukocyte function

Circulation 81 (1990) 226-237

Sironi M., Breviario F., Proserpio P., Biondi A., Vecchi A., van Damme J., Dejana E., and Mantovani A.

IL-1 stimulates IL-6 production in endothelial cells

J Immunol 142 (1989) 549-553

Springer T.A.

Adhesion receptors of the immune system

Nature 346 (1990) 425-434

Springer T.A.

Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration

Annu Rev Physiol (1995) 827-872

Sturk A., Hack C.E., Aarden L.A., Brouwer M., Koster R.R.W., and Sanders G.T.B.

Interleukin-6 release and the acute-phase reaction in patients with acute myocardial infarction:

A pilot study

J Lab Clin Med 119 (1992) 574-579

Szekanecz Z., Shah M.R., Pearce W.H., Koch A.E.

Human atherosclerotic abdominal aortic aneurysms produce interleukin(IL)-6 and interferon-gamma but not IL-2 and IL-4: the possible role for IL-6 and interferon-gamma in vascular inflammation

Agents Actions 42 (1994) 159-162

Takahashi M., Ikeda U., Masuyama J.I., Kitagawa S.I., Kasahara T., Shimpo M., Kano S., Shimada K.

Monocyte-endothelial cell interaction induces expression of adhesion molecules on human umbilical cord endothelial cells

Cardiovasc Res 32 (1996) 422-429

Tamm I.

IL-6: Current research and new questions

Ann NY Acad Sci 557 (1989) 478-489

Thanos D. and Maniatis T.

NF- κ B: a lesson in family values

Cell 80 (1995) 529-532

Thomas L.

Plasmaproteine und "passenger" proteins, Akute-Phase-Reaktion

In: "Labor und Diagnose"

Thomas L. (Hrsg.), Die Medizinische Verlagsgesellschaft,

Marburg, 1992, 4. Auflage, 770-776

Thompson S.G., Kienast J., Pyke S.D.M., Haverkate F., and van de Loo J.C.W.

Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris

N Engl J Med 332 (1995) 635-641

Tosato G. and Jones K.D.

Interleukin-1 Induces Interleukin-6 Production in Peripheral Blood Monocytes

Blood 75 (1990) 1305-1310

Van Damme J., Opdenakker G., Simpson R.J., Rubira M.R., Cayphas S., Vink A., Billiau A., and van Snick J.

Identification of the human 26-kD protein, interferon β 2 (IFN- β 2), as a B cell hybridoma/plasmacytoma growth factor induced by interleukin-1 and tumor necrosis factor

J Exp Med 165 (1987) 914-919

Van der Wal A.C., Becker A.E., van der Loos C.M., Das P.K.

Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology

Circulation 89 (1994) 36-44

Wallis W.J., Beatty P.G., Ochs H.D., and Harlan J.M.

Human monocyte adherence to cultured vascular endothelium: monoclonal antibody defined mechanisms

J Immunol 135 (1985) 2323-2330

Yamazaki T., Seko Y., Tamatani T., Miyasaka M., Yagita H., Okumura K., Nagai R., and Yazaki Y.

Expression of intercellular adhesion molecule-1 in rat heart with ischemia/reperfusion and limitation of infarct size by treatment with antibodies against cell adhesion molecules

Am J Pathol 143 (1993) 410-418

Yarnell J.W.G., Baker I.A., Sweetman P.M., Bainton D., O'Brien J.R., Whitehead P.J., and Elwood P.C.

Fibrinogen, viscosity, and white blood cell count are major risk factors for ischemic heart disease

Circulation 83 (1991) 836-844

Yurochko A.D., Liu D.Y., Eierman D., and Haskill S.

Integrins as a primary signal transduction molecule regulating monocyte immediate-early gene induction

Proc Natl Acad Sci 89 (1992) 9034-9038

Zohlhöfer D., Brand K., Schipek K., Pogatsa-Murray G., Schömig A., Neumann F.-J.

Adhesion of monocyte very late antigen-4 to endothelial vascular cell adhesion molecule-1 induces interleukin-1 β -dependent expression of interleukin-6 in endothelial cells

Arterioscler Thromb Vasc Biol 20 (2000) 353-359

7 Abkürzungen

AK	Antikörper
AMI	Akuter Myokardinfarkt
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CPDA	Natriumcitrat, Phosphatpuffer, Dextrose, Adenin
cpm	counts per minute
CRP	C-reaktives Protein
d	Tag
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyoligonukleotide
ds-DNA	Doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELAM-1	Endothelial leukocyte adhesion molecule-1
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
I κ B	Inhibitor-kappa B
ICAM	Intercellular adhesion molecule

IFN γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
Ig κ	Immunglobulin κ -leichte Kette
IL	Interleukin
Kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilo Dalton
LDL	Low Density-Lipoprotein
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
Min	Minute
MIP-1 α	Macrophage inflammatory protein-1 alpha
MHC II	Major histocompatibility complex II
MNC	Mononukleäre Zellen
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NF- κ B	Nuklearfaktor-kappa B
oxLDL	Oxidiertes Low Density-Lipoprotein
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PTCA	Perkutane transluminale Koronarangioplastie
RA	Rezeptorantagonist
rh	Rekombinant human
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium dodecyl sulfate
sec	Sekunde
SSC	Saline-sodium citrate buffer
TBE	Tris-Borat-EDTA

TBS	Trisgepufferte Kochsalzlösung
TGF β	Transforming growth factor beta
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VLA-4	Very late antigen-4

8 Danksagung

Bei Herrn Professor Dr. Franz-Josef Neumann bedanke ich mich für die Überlassung des interessanten Themas und die sehr gute Betreuung während der gesamten Arbeit.

Darüberhinaus gilt mein besonderer Dank Frau Dr. Dietlind Zohlhöfer für die stets hilfsbereite und umfangreiche Begleitung der praktischen und theoretischen Arbeiten.

Ferner danke ich Herrn Steffen Bathke und vor allem Herrn Viktor Voigt für die Hilfe, die sie mir bei der Eingabe dieser Arbeit am Computer geleistet haben.

9 Lebenslauf

Name: Katharina Elisabeth Maria Schipek

Geburtsdatum: 27.06.1974

Geburtsort: München

Eltern: Karl Richard Schipek, Graphiker
Dr. Elisabeth Veronika Schipek, Internistin

Schulbildung: 1980 - 1984 Grundschule Grafing
1984 - 1993 Gymnasium Grafing

Studium der Medizin: 1993 - 1995 Universität Regensburg
1995 Physikum
1995 - 2000 Technische Universität München
1996 Erstes Staatsexamen
1999 Zweites Staatsexamen
2000 Drittes Staatsexamen

Berufserfahrung: 07/2000 - 03/2001 Ärztin im Praktikum am
Institut für Medizinische Genetik der Ludwig
Maximilians Universität München
04/2001 - 12/2001 Ärztin im Praktikum in der
1. Medizinischen Abteilung des Krankenhauses
München Neuperlach
seit 01/2002 Assistenzärztin in der 1. Medizini-
schen Abteilung des Krankenhauses München
Neuperlach