

# TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik und Poliklinik für Vaskuläre und Endovaskuläre Chirurgie  
Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München  
(Univ.-Prof. Dr. H.-H. G. U. Eckstein)

## **Die Rolle des natriuretischen Peptides Typ-C und seiner Rezeptoren im physiologischen und pathophysiologischen Verhaltensmuster humaner Monozyten und THP-1 Zellen**

**Martin Bruckmeier**

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. E. J. Rummeny  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. H.-H. G. U. Eckstein  
2. apl. Prof. Dr. T. Ibrahim  
3. Univ.-Prof. Dr. A. Krackhardt

Die Dissertation wurde am 06.02.2013 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 19.11.2014  
angenommen.



---

<b>1. Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1 Bedeutung und Prävalenz der Atherosklerose	5
1.2 Pathogenese der Atherosklerose	7
1.3 Humane Monozyten/Makrophagen und deren Rolle in der Atherogenese	11
1.4 Das natriuretische Peptid Typ-C (CNP)	16
1.4.1. Die natriuretischen Peptide	16
1.4.2. Struktur und Biosynthese	17
1.4.3. Rezeptoren	19
1.4.4. Physiologische Effekte des natriuretischen Peptides Typ-C	21
1.5 Ziele der Arbeit	25
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>27</b>
2.1 Material	27
2.1.1 Geräte	27
2.1.2 Verwendete Chemikalien und Reagenzien	28
2.1.2.1 Substanzen für die Zellkultivierung	28
2.1.2.2 Substanzen für die Isolierung von Monozyten	28
2.1.2.3 Substanzen zur Ausdifferenzierung von Monozyten zu Makrophagen	28
2.1.2.4 Substanzen zur Stimulierung der Monozyten/Makrophagen	28
2.1.2.5 Primer	28
2.1.2.6 Weitere Substanzen und Chemikalien	29
2.2 Methoden	30
2.2.1 Isolierung und Kultivierung humaner Monozyten	30
2.2.2 Beschreibung der THP-1 Zelllinie	32
2.2.3 Ausdifferenzierung von Monozyten zu Makrophagen	33
2.2.4 Charakterisierung der Monozyten/Makrophagen	34
2.2.4.1. FACS-Analyse	34
2.2.4.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung	35
2.2.4.3. Immunhistochemische Färbungen	35
2.2.4.4. Giemsa-Färbung	36
2.2.5 Stimulierung der Monozyten /Makrophagen	37
2.2.6 RNA-Isolierung	39
2.2.7 Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA	41
2.2.8 cDNA-Synthese	41
2.2.9 quantitative PCR	42
2.2.10 Vitalitätsessay – MTT	44
2.2.11 Statistische Auswertung und Analysemethoden	45
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>46</b>
3.1 Optimierung der Monozytenisolierung	46
3.2 Physiologische und pathophysiologische Reaktion der THP-1 Zellen und humanen Monozyten	48
3.2.1. Vergleich des Grundexpressionsprofils von THP-1 Zellen mit	

---

primären humanen Monozyten (PBMC)	48
3.2.2. Vergleich der Reaktion von THP-1 Zellen und PBMC auf Stimulation mit LPS (24h) und oxLDL (48)	49
3.2.3. Einfluss von CNP auf die LPS induzierte Reaktion	53
3.2.3.1. Kurzfristiger Einfluss von CNP auf die LPS induzierte Reaktion	53
3.2.3.2. Langfristiger Einfluss von CNP auf die LPS induzierte Reaktion	54
3.2.4. Einfluss von CNP auf die oxLDL induzierte Reaktion (48h)	55
3.3. Pilotversuch zum Einfluss von CNP auf das Expressionsprofil während der Ausdifferenzierung humaner Monozyten zu Makrophagen	56
<b>4. Diskussion</b>	<b>60</b>
4.1. Einführung	60
4.2. Einfluss von oxLDL und LPS auf das CNP System	61
4.3. Die Expression inflammatorischer Zytokine unter dem Einfluss von LPS	63
4.4. Die Expression inflammatorischer Zytokine unter dem Einfluss von oxLDL	65
4.5. Einfluss von oxLDL und LPS auf die NPR-2/NPR-3 Ratio	68
4.6. Einfluss von CNP auf das Expressionsmuster ausdifferenzierter Makrophagen	69
4.7. CNP hat einen hemmenden Einfluss auf die LPS induzierte Inflammatorische Reaktion humaner Monozyten	71
4.8. Grenzen der Studie	73
4.9: Kernaussage	74
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>75</b>
<b>6. Literatur</b>	<b>78</b>
<b>7. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>93</b>
<b>8. Danksagung</b>	<b>97</b>



# 1. Einleitung

## 1.1. Bedeutung und Prävalenz der Atherosklerose

Die Atherosklerose ist laut Weltgesundheitsorganisation WHO der häufigste Grund für Tod und Behinderung in der westlichen Welt, wobei die koronare Herzkrankheit (KHK), der ischämische Apoplex sowie die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) hierbei die bedeutendsten Endorganschäden darstellen.

Im Jahr 2010 verstarben in Deutschland 352.689 Menschen an Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems und somit im Wesentlichen an Folgen der Atherosklerose. Dies entspricht in etwa 41,1 % aller Todesfälle [144]. Hiervon starben mehr als 190.000 (54 %) Menschen an ischämischer Herzerkrankung und Myokardinfarkt [144]. Ebenso werden in Deutschland jährlich zwischen 200.000 und 250.000 Patienten mit einem akut erstmalig, oder erneut aufgetretenem Schlaganfall stationär behandelt. Wobei auch hier ein durchaus relevanter Teil der arterio-arteriell verursachten apoplektischen Insulte auf dem Boden atherosklerotischer Läsionen der großen hirnversorgenden Gefäße entstehen [40, 71, 75]. Diese Zahlen rechtfertigen und erklären den enormen Forschungsaufwand der betrieben wird, um diese medizinisch und ökonomisch bedeutsame Volkskrankheit auch noch in fortgeschrittenen Stadien, effektiv bekämpfen zu können.

Die Atherosklerose ist eine multifaktoriell bedingte Erkrankung, der eine ganze Reihe exogener Risikofaktoren sowie eine genetische Disposition zugrunde liegen. Sie ist die mit Abstand häufigste pathologische Veränderung des Gefäßsystems und betrifft v.a. das Endothel und die glatte Gefäßmuskulatur der Arterienwände der großen und mittelgroßen Arterien [138]. Die Entstehung von atheromatösen Plaques betrifft v.a. die arteriellen Gefäßabschnitte mit besonders turbulenten Strömungsverhältnissen [121]. Die Erkrankung entwickelt sich über viele Jahre und beginnt asymptomatisch bereits im Kindesalter, wo erste Läsionen als sogenannte „Fatty streaks“ in Erscheinung

treten. Im mittleren bis hohen Erwachsenenalter führt sie schließlich zu den typischen klinischen Manifestationen wie KHK, pAVK oder cerebrovaskulärer Insuffizienz.

Neben den klassischen Risikofaktoren, wie Hypercholesterinämie, Nikotinabusus, arterieller Hypertonie, genetischer Prädisposition und Diabetes mellitus bestehen noch eine ganze Reihe anderer Risikofaktoren, wie männliches Geschlecht, Bewegungsmangel, Adipositas, und Stress, die zu einer mehr oder weniger starken Progredienz der Atherosklerose beitragen und nur zum Teil aktiv beeinflussbar sind (Tab. 1.) [35, 49, 138, 175]. Als Hauptrisikofaktor wird seit langem ein erhöhter LDL-Cholesterinspiegel diskutiert, dessen atherogene Wirkung durch den Einfluss anderer Risikofaktoren, wie Rauchen oder Hypertonie potenziert wird [88, 138].

<b>Genetische Prädisposition</b>	<b>Umweltfaktoren</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Erhöhte LDL/VLDL-Spiegel</li> <li>• Reduzierte HDL-Spiegel</li> <li>• Erhöhte Lipoprotein-A-Spiegel</li> <li>• Homozysteinämie</li> <li>• Familiäre Häufung</li> <li>• Diabetes mellitus und Adipositas</li> <li>• Erhöhte Spiegel von Gerinnungsfaktoren</li> <li>• Depression und Verhaltensstörungen</li> <li>• Geschlecht</li> <li>• Systemische Entzündungserkrankungen</li> <li>• Hypertonie</li> <li>• Metabolisches Syndrom</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fettreiche Ernährung</li> <li>• Nikotinabusus</li> <li>• Niedrige Antioxidantienspiegel</li> <li>• Bewegungsmangel</li> <li>• Infektionen (Chlamydien, Cytomegalievirus)</li> </ul>

**Tabelle 1.** Risikofaktoren für atheromatöse Läsionen [21, 52, 64, 86, 88]

Lange Zeit wurde die Atherosklerose als reine Fettspeicherkrankheit angesehen, wobei die Einlagerung von Blutfetten in die Gefäßwand im Mittelpunkt des Krankheitsgeschehens stand. Wie oben bereits erwähnt, fand man heraus, dass es sich bei den schädigenden Fetten um low density lipoproteins (LDL) handelt, welches sich in oxidierter Form (oxLDL) in die Intima

---

der Gefäßwand einlagert. Die Gefäßwand spielte in dieser Hypothese eine rein passive Rolle [56, 97].

Der deutsche Pathologe Robert Virchow postulierte bereits Mitte des 19. Jahrhunderts die Beteiligung einer Entzündungsreaktion an arteriellen Erkrankungen [97]. Erst hundert Jahre später wurden Makrophagen erstmalig in arteriosklerotischen Plaques nachgewiesen [57, 88, 138]. Zu dieser Zeit stand jedoch immer noch der Cholesterinmetabolismus als Ursache der Atherosklerose im Mittelpunkt der medizinischen Forschung, wodurch es zu keiner weiteren experimentellen Analyse der hierfür verantwortlichen pathophysiologischen Mechanismen kam [4, 57]. Die Bedeutung inflammatorischer Zellen (inkl. Monozyten und Makrophagen) für die Pathogenese der Arteriosklerose, konnte erst nach Etablierung adäquater Versuchsmodelle nachgewiesen werden [77]. Nach heutigem Stand des Wissens zählt man die Atherosklerose zu den chronisch inflammatorischen Erkrankungen. Dabei ließen sich in der Vergangenheit immer mehr Pathomechanismen aufklären, die durch verschiedene primäre Noxen letztendlich die gleichen proinflammatorischen Kaskaden initiierten und unterhalten [138].

## **1.2. Pathogenese der Atherosklerose**

Eine Wandlung in der Sichtweise der Pathomechanismen der Atherosklerose brachte die „response to injury“-Hypothese des amerikanischen Pathologen Russell Ross, der erstmals die Meinung vertrat, dass Verletzungen des Endothels und der Intima der Gefäßwand das initiiierende Ereignis für die Entstehung der Atherosklerose seien [137]. Diese Verletzungen werden durch hämodynamische Faktoren, Immunreaktionen, oxidative Radikale, Viren, Nikotin und bestimmte andere Toxine verursacht, welche im Endeffekt alle zur endothelialen Dysfunktion führen [12, 13, 136, 137]. Die endotheliale Dysfunktion ist als Funktionsstörung des Endothels, bzw. der Endothelzellen zu sehen. Diese Störung umfasst alle Funktionsbereiche des Endothels, wie die Regulation der Gefäßweite, die Gefäßpermeabilität, die Expression adhäsiv

---

wirksamer Oberflächenmoleküle und als weiteren wesentlichen Faktor die Thrombozytenaggregationshemmung [99, 137]. Diese initiale Schädigung des Endothels führt schließlich auch zu einer erhöhten Permeabilität für Low-density-Lipoproteine inkl. ihrer Apolipoprotein-B-Komponente [13].

Am Anfang dieses komplexen Geschehens stehen die „fatty streaks“, Lipidflecken die bereits bei Kindern ab 10 Jahren regelhaft nachweisbar sind und die auf Grund ihrer Reversibilität keinen nennenswerten Krankheitswert besitzen. Wie die späteren atherosklerotischen Plaques sind auch diese Lipidflecken in der Intima der Gefäßwand lokalisiert und bestehen überwiegend aus Lipid speichernden Schaumzellen, die zum einen leiomyogener zum anderen monohistiozytärer Herkunft sind [21].

Wie in der Framingham Heart Study gezeigt werden konnte, sind diese frühen Gefäßveränderungen abhängig von geographischen und ethnischen Faktoren und es besteht auch eine offensichtliche Assoziation zu Geschlecht oder spezifischen Umweltfaktoren. Pathomorphologisch treten sie an anatomischen Lokalisationen auf, an denen es auch später bevorzugt zur Bildung atherosklerotischer Plaques kommt. Mittlerweile gibt es auch experimentelle Anhaltspunkte für das Konzept einer Progression von fatty streaks zu atherosklerotischen Plaques.

Zusammenfassen lässt sich sagen, dass fatty streaks als spontan rückbildungsfähig gelten, eine Progression in klassische atherosklerotische Läsionen möglich, jedoch nicht obligat sind [116].

Gelangen nun, durch die bereits erwähnte endotheliale Dysfunktion, cholesterinreichen Lipoproteine in das subintimale Bindegewebe, kommt es dort zu einer minimalen Oxidation und zur Ablagerung von minimal oxidiertem LDL [13, 48, 132]. Es folgt eine inflammatorische Phase in der es zur Akkumulation von oxidiertem LDL kommt. In dieser Phase werden die Endothelzellen zur Produktion von inflammatorisch wirksamen Chemokinen stimuliert, welche die Adhäsion der Monozyten über bestimmte Adhäsionsmoleküle, wie das intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1), das vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), E-Selectin und P-Selectin fördern [58, 99, 114, 169]. Die Monozyten durchwandern das Endothel und differenzieren und proliferieren

---

unter dem Einfluss von bestimmten Wachstumsfaktoren, wie M-CSF und GM-CSF, in der Intima zu Makrophagen. Diese sezernieren nun selbst wieder Wachstumsfaktoren, Zytokine und Matrixkomponenten und halten den proinflammatorischen Stimulus aufrecht [26, 132, 134, 166, 176].

Eine bedeutende Rolle in diesem Krankheitsgeschehen, spielen ebenfalls die T-Zellen. Diese Zellen werden durch die Interaktion mit Antigen präsentierenden Zellen, wie Makrophagen, oder dendritischen Zellen aktiviert [60]. In atherosklerotischen Läsionen findet man v.a. CD4<sup>+</sup> T-Zellen, in erster Linie T-Helfer-Zellen [56]. Diese Zellen haben ein ausgeprägtes proinflammatorisches Potential, da sie Zytokine wie z.B. Interferon- $\gamma$ , Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  und Interleukin-12 sezernieren können [146]. Diese Zytokine haben einen synergistischen Effekt und stimulieren wiederum Makrophagen zur Produktion von inflammatorischen Molekülen, Proteasen und Endothelzellen zu einer gesteigerten Expression von Adhäsionsmolekülen [58, 60]. Durch die vorgenannten Mechanismen wird ein fortlaufender Entzündungsprozess aufrecht gehalten [83, 129]. Eine antiinflammatorische Wirkung in diesem Kreislauf kommt hierbei dem Zytokin IL-10 zu. Dieses wird von T-Helferzellen, Monozyten sowie Makrophagen sezerniert und hat eine entscheidende regulatorische Auswirkung auf die Reaktion von Th1 bzw. Th2 Lymphozyten [44].

In experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass durch eine Verabreichung von IL-10 die Entstehung der Atherosklerose verzögert werden kann. Ebenso konnte in IL-10 defizienten Knock-out Mäusen eine gesteigerte T-Zell Akkumulation, eine erhöhte Interferon- $\gamma$  Sekretion, sowie ein verminderter Kollagengehalt in den atherosklerotisch veränderten Gefäßen nachgewiesen werden [44, 156]. Zusammenfassend konnte in mehreren experimentellen Untersuchungen ein protektiver Effekt von IL-10 auf die Entstehung der Atherosklerose beobachtet werden [27, 44, 156]. Ebenso konnte gezeigt werden, dass IL-10 einen positiven Effekt auf die Stabilität fortgeschrittener atherosklerotischer Plaques hat [27, 156].

Wie bereits beschrieben, wird das im subintimalen Raum durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Myeloperoxidase, Sphingomyelinase und

---

sekretorische Phospholipase extensiv modifizierte LDL über Scavenger-Rezeptoren (u.a. MSR-1, CD36) der subintimal liegenden Makrophagen phagozytiert [20, 27].

Dabei kann das „hoch oxidierte“ LDL von Makrophagen leichter und schneller aufgenommen werden, als das im Plasma zirkulierende LDL. Dagegen kann es aber weniger gut umgewandelt und sezerniert werden. So entstehen aus Makrophagen schließlich Lipid speichernde Schaumzellen [20, 48, 103]. Während der LDL-Rezeptor einer negativen Feedback Regulation unterliegt, sind es v.a. die Scavenger-Rezeptoren die zu einer vermehrten Aufnahme von oxLDL in Makrophagen und Monozyten führen. OxLDL induziert hierbei sogar eine vermehrte Expression der Scavenger-Rezeptoren, was im Endeffekt zu einer massiven Lipidaufnahme in die Zellen führt [72].

In der Folge kommt es zu einer Akkumulation von Schaumzellen und aktivierten Makrophagen in den atherosklerotischen Läsionen, wo diese vermehrt Chemokine, Zytokine, Metalloproteinasen (MMPs) und andere proteolytische Enzyme sezernieren. Da Makrophagen zwar über einen Rückkoppelungsmechanismus verfügen, über den sie die Aufnahme von Cholesterin und Lipiden steuern können akkumulieren diese Zellen dennoch bei einem Überangebot dieser Substanzen schließlich in der Intima, gehen im weiteren Verlauf zu Grunde und hinterlassen, bzw. setzen eine zunehmende Menge an hochgradig oxidiertem LDL und Zelldebris frei [20].

Durch diesen Prozess wird ein nekrotischer Kern (Lipidcore/necrotic core) gebildet, der überwiegend aus Schaumzellen, Makrophagen, abgestorbenen Zellen und extrazellulären Lipiden besteht. Schließlich entstehen durch die Einwanderung und Proliferation glatter Muskel Zellen, im Sinne eines Reparatonsmechanismus, fibröse atherosklerotische Plaques, die sich über den nekrotischen Kern legen. Dieses Geschehen wird durch Risikofaktoren wie erhöhte Spiegel von Homozystein und Angiotensin-II getriggert und führt dazu, dass die glatten Muskelzellen der Intima extrazelluläre Matrix bilden, was im Endeffekt zur Bildung einer fibrösen Kappe führt [12, 21, 136].

Das in der Entzündungsreaktion ausgeschüttete INF- $\gamma$  hemmt die Bildung einer sogenannten fibrösen Kappe. Dieser Prozess der zunehmenden

---

Matrixinstabilität wird durch Proteasen die von Makrophagen sezerniert werden zusätzlich verstärkt. Zu diesen gehören v.a. die Metalloproteinasen, eine Familie aus 23 Enzymen, deren Expression (v.a. der MMPs 1-3, MMPs 8-9 sowie MMPs 11-14) vermehrt in atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden konnte und deren physiologische Aufgabe primär im Abbau extrazellulärer Matrix zu sehen ist [112].

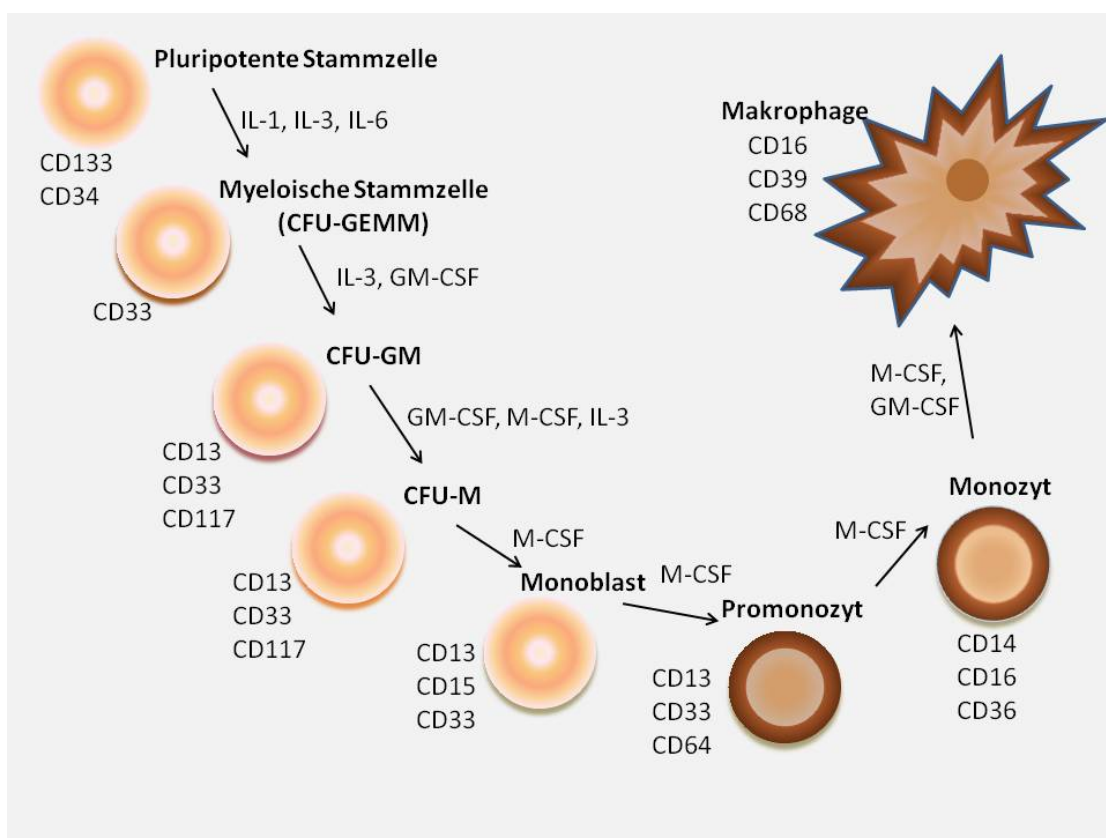
Auf diese Weise tragen inflammatorische Zellen und die daraus resultierende Immunreaktion zur Destabilisierung atherosklerotischer Plaques bei. Kommt es zu Plaquerupturen, sind Thrombosen, Stenosen und Embolien gefürchtete klinische Konsequenzen [53, 56, 112]. In diesen Plaques zeigten die vorhandenen Makrophagen eine massive Expression des natriuretischen Peptids Typ-C (CNP) und seiner Rezeptoren NPR2 und NPR3 [30]. Diese vermehrte Expression konnte ebenfalls für die natriuretischen Peptide Typ-A, sowie Typ-B nachgewiesen werden [30].

Zudem zeigte sich in Plaques der A. carotis, dass NPR3 in instabilen Plaques signifikant stärker exprimiert wird als in stabilen Plaques. Die genaue Bedeutung des CNP und seiner Rezeptoren während der Plaquentstehung, insbesondere ihre Wirkung auf Monozyten/Makrophagen, ist weiterhin unklar und deshalb Gegenstand dieser wissenschaftlichen Arbeit.

### **1.3. Die Funktion humaner Monozyten/Makrophagen und deren Rolle in der Atherogenese**

Monozyten zählen, ebenso wie die Makrophagen, Monoblasten und Promonozyten zum mononukleären Phagozytensystem [167]. Historisch betrachtet wurden alle Zelltypen, die in der Lage sind Partikel zu phagozytieren, wie Makrophagen, Monozyten, Endothelzellen, Fibroblasten usw. zum retikuloendothelialen System (RES) zusammengefasst [7]. Als man erkannte, dass Makrophagen eine essenzielle Rolle in der Immunabwehr spielen und Monozyten deren Vorläuferzellen sind, wurde der Begriff des mononukleären Phagozytensystems eingeführt [43]. Hierzu zählt man die Makrophagen-

Vorläuferzellen, sowie sämtliche reife Makrophagentypen [85]. Monozyten und Makrophagen sind Zellen die dem Knochenmark entstammen. Dort sind auch residierende Makrophagen und deren Vorläuferzellen nachweisbar. Die unreifste Zelle des mononukleären Phagozyten Systems ist der Monoblast, aus dem durch Zellteilung der Promonozyt und nach weiteren Zellteilungen der Monozyt entsteht. Nach ihrer Ausschwemmung aus dem Knochenmark zirkulieren die Monozyten für zwei bis drei Tage im Blut, bevor sie via Leukapedese aus den Blutgefäßen in das Gewebe auswandern (siehe Abb. 1.)[73].



**Abbildung 1:** Entwicklung der Monozyten/Makrophagen, aus pluripotenten Stammzellen. Expression der jeweils spezifischen Oberflächenmarker (CD, Cluster of Differentiation).

Dort angekommen differenzieren sie zu Makrophagen und werden je nach Lokalisation als Alveolarmakrophagen, Kupffersche Sternzellen (Leber), Mesangiumzellen (Niere), Dendritische Zellen oder Mikrogliazellen (Gehirn) bezeichnet [73]. Sowohl bei der Migration der Monozyten ins Gewebe, als auch bei der Differenzierung zu Gewebemakrophagen haben bestimmte Zytokine und Chemokine eine bedeutende, steuernde Funktion. Zu diesen Substanzen zählen Wachstumsfaktoren, wie GM-CSF, M-CSF und Interleukin-3, die sowohl



---

auf die Produktion, als auch auf die Reifung von mononukleären Phagozyten einen maßgeblichen Einfluss haben. Diese Faktoren werden durch unterschiedliche Zellen sezerniert. So produzieren stimulierte Makrophagen selber GM-CSF und M-CSF, Interleukin-1 und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  [9, 26, 46], wodurch wiederum Fibroblasten und Endothelzellen zur Produktion von M-CSF und GM-CSF angeregt werden [15, 25, 109]. T-Lymphozyten sind ebenfalls in der Lage GM-CSF und Interleukin-3 zu produzieren, wodurch auch sie die Funktion des MPS beeinflussen können [28].

Mit etwa 12-15  $\mu\text{m}$  im Durchmesser gehören die Monozyten, zu den größten Zellen die im peripheren Blut zu finden sind. Die Gesamtzahl, der im Blut eines Erwachsenen Menschen zirkulierenden Monozyten beträgt in etwa  $1,7 \times 10^9$  Zellen, wodurch sie 2-6 % der Leukozytenfraktion darstellen [73]. Monozyten haben die Fähigkeit aus dem Blut in das umliegende Gewebe zu wandern und dort differenzieren sie, unter dem Einfluss diverser Stimuli, zu Makrophagen. Diese haben ein bis zu fünffach größeres Volumen, als Monozyten und damit eine entsprechend höhere Phagozytosekapazität. Sowohl Makrophagen, als auch Monozyten sind in der Lage Mikroorganismen, geschädigte körpereigene Zellen, Immunkomplexe, Fremdstoffe und gealterte Erythrozyten zu phagozytieren, um diese dann in Lysosomen durch Enzyme, oder durch Oxidase erzeugte Sauerstoffradikale zu lysieren [9, 14, 46]. Die Fähigkeit zur Phagozytose wird über ein großes Spektrum von Rezeptoren vermittelt. Dazu zählen u.a. die Scavenger-Rezeptoren MSR-1 bis MSR-10, CD36 und der LPS-Rezeptor LBP. In höheren Konzentrationen kann LPS jedoch auch über TLR-2, bzw. TLR-4 wirken. In manchen Situationen ist eine Phagozytose nur dann möglich, wenn die zu phagozytierenden Substanzen, bzw. Organismen durch Oponine markiert sind, dies betrifft v.a. eingekapselte Bakterien [73]. Durch ihre Fähigkeit phagozytierte Fragmente per MHC-II Antigene den T-Helferzellen zu präsentieren, kommt den Makrophagen bei der Abwehr von Infektionserregern eine Schlüsselrolle zu, diese können körperfremde Substanzen nur dann erkennen wenn sie an körpereigene Moleküle, wie MHC-II, gekoppelt sind [73].

Monozyten und Makrophagen sind nicht nur Phagozyten, sie verfügen auch über eine ganze Reihe von zytotoxischen Mechanismen, wie z.B. die

---

Produktion von Lymphotoxinen (TNF- $\beta$ ) nach Stimulation mit LPS [94, 115]. Ebenfalls sezernieren sie eine Vielzahl von Zytokinen, weshalb sie häufig in die Mitte des Zytokinnetzwerkes gestellt werden [41]. Durch die Sekretion von IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  nehmen die Makrophagen maßgeblichen Einfluss auf die komplexe Immunantwort der B- und T-Lymphozyten, sowie des Komplementsystems und sind selbst in der Lage eine Entzündungsreaktion zu induzieren [41, 45, 153].

Bei Monozyten ist die Aktivierung durch verschiedene Zytokine (u.a. LPS, IL-2, Interferon- $\alpha$ , Interferon- $\gamma$  und GM-CSF) im Gegensatz zu Makrophagen, nur mit einer geringfügigen Proliferation im Blut bzw. im peripheren Gewebe verbunden [73]. Diese findet im Knochenmark statt und durch diverse physiologische und pathophysiologische Stimuli wird dieser Pool an Monozyten aktiviert und mobilisiert um über das Gefäßsystem in das Gewebe einzuwandern.

Wie oben bereits beschrieben kommt den Monozyten und Makrophagen bei der Entstehung der Atherosklerose eine Schlüsselrolle zu. So waren Monozyten und Makrophagen die ersten inflammatorischen Zellen, die mit der Atherosklerose in Verbindung gebracht werden konnten [47]. Monozyten sind sogar schon in den am frühesten sichtbaren atherosklerotischen Läsionen, den sogenannten, bereits erwähnten „fatty streaks“ nachweisbar [110].

Die Oxidierung von LDL in der Gefäßwand hat eine durch Chemotaxis bedingte Rekrutierung von Monozyten zur Folge mit den oben dargestellten pathophysiologischen Konsequenzen [48]. Das modifizierte, oxidierte LDL wird von den aktivierten Makrophagen über deren Scavenger-Rezeptor aufgenommen, welcher bei der Ausdifferenzierung von Monozyten zu Makrophagen hochreguliert wird [151].

Die Aufnahme von modifiziertem oxLDL induziert schließlich die Bildung von sogenannten Schaumzellen. Eine wichtige Rolle in diesem Mechanismus kommt dabei den Scavenger-Rezeptoren zu. Diese waren in den letzten Jahren Gegenstand intensiver Forschung und durch ihre Entdeckung konnte die exzessive Aufnahme von Lipiden und Cholesterin durch Makrophagen erklärt werden. Scavenger bedeutet übersetzt so viel wie „Aasfresser“ und erklärt sich aus der Fähigkeit der Rezeptoren eine große Anzahl verschiedener Liganden

---

binden und entsorgen zu können. Die Scavenger-Rezeptoren sind in 10 Klassen aufgeteilt (A-J), wobei die Klassen A-H in atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden konnten [76, 161]. Die Scavenger-Rezeptoren werden zu den Pattern-Recognition Rezeptoren (PRRs) gezählt. Diese Rezeptoren erkennen Pathogene an charakteristischen Merkmalen, bzw. Mustern den sogenannten PAMPs (Pathogen-assoziierte molekulare Muster) und sind damit wesentlich an der Einleitung einer Immunantwort beteiligt [161].

In den letzten 25 Jahren wurde durch mehrere wissenschaftliche Arbeiten angedeutet, dass für die Rolle von Monozyten, einerseits bei der Abwehr pathogener Keime und andererseits bei der pathophysiologischen Entzündungsreaktion, möglicherweise funktionell unterschiedliche Untergruppen verantwortlich sind [9]. Mittlerweile gilt es als gesichert, dass es verschiedene monozytäre Untergruppen gibt, die sich sowohl im Phänotypus als auch funktionell unterscheiden [9, 50]. Die Existenz von mindestens zwei funktionellen Untergruppen ist mittlerweile wissenschaftlich anerkannt.

Eine dieser Untergruppen kann durch die Expression von CD16 (FcγR-III) identifiziert werden, die andere, die etwa 80-90% der im Blut zirkulierenden Monozyten ausmacht exprimiert den CD14 Rezeptor. Diese hat eine höhere Phagozytose Aktivität, aber eine geringere Zytokin Produktion, als die CD16 exprimierende Untergruppe [81, 179]. Die CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten exprimieren überwiegend den Chemokinrezeptor CCR2 und nur in geringem Ausmaß den CX3CR1 Rezeptor. Bei Stimulation mit LPS produziert und sezerniert diese Untergruppe vorwiegend antiinflammatorisch wirksames IL-10 und kaum TNF-α und IL-1. Im Gegensatz dazu tragen die CD16<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> Monozyten überwiegend den CX3CR1 Rezeptor und produzieren bei Stimulation mit LPS vermehrt TNF-α und IL-1, weshalb sie auch als proinflammatorische Monozyten bezeichnet werden [8, 9, 46].

In mehreren Studien wurde nachgewiesen, dass CD16<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> Monozyten in höherer Zahl im Blut von Patienten mit floriden Entzündungen, oder akuten Infektionskrankheiten, vorkommen [9]. Interessanterweise wird die Anzahl dieser CD16<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> Monozyten durch eine Behandlung mit Glucocorticoiden signifikant reduziert [9]. Neben den bereits genannten Untergruppen gibt es

---

auch noch eine Population, die CD16 exprimiert, aber kaum CD14 (CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>) [42, 106]. Diese Population besitzt eine geringe Phagozytose Aktivität und produziert bei Stimulation mit LPS kaum TNF- $\alpha$  und IL-1 [42, 63, 106]. Die Funktion dieser Zellreihe ist nur schwer nachvollziehbar, interessanterweise wird sie aber vermehrt im Blut von septischen Patienten nachgewiesen [63].

Die Rolle der einzelnen Untergruppen bei der Entstehung und dem Fortschreiten der Atherosklerose ist bislang ungeklärt, auch Versuche im Tiermodell konnten bislang keine sichere Aussage zur Bedeutung der Untergruppen, bei der Plaqueentstehung liefern [76]. Allerdings wurden bei KHK Patienten höhere Anteile an CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten gefunden als in einer gesunden Kontrollgruppe [152]. Ebenso korreliert die CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten Anzahl negativ mit dem HDL Serumspiegel und positiv mit der Serumkonzentration atherogener Lipide und Cholesterine [171].

In diesem Zusammenhang erscheint es sehr interessant, dass CD16 ein schwach affiner Rezeptor für den Fc Teil von IgG Antikörpern ist und diese bekanntlich erst spät nach Immunisierung mit einem Antigen entstehen. Ob dieser Befund den chronisch verlaufenden Krankheitsprozess der Atherosklerose widerspiegelt ist nach aktuellem Wissenstand noch ungeklärt [84].

## **1.4. Das natriuretische Peptid Typ-C**

### **1.4.1. Die natriuretischen Peptide**

Vor fast 30 Jahren erbrachte der Kardiologe Adolfo J. de Bold eine Pionierleistung, indem er den Nachweis erbringen konnte, dass bestimmte Substanzen, die in den Vorhöfen des Herzens synthetisiert und sezerniert werden, eine ausgesprochen starke natriuretische Aktivität besitzen [38]. Im Zuge dieser Arbeit wurde das erste Mal das atriale natriuretische Peptid (ANP) isoliert.

---

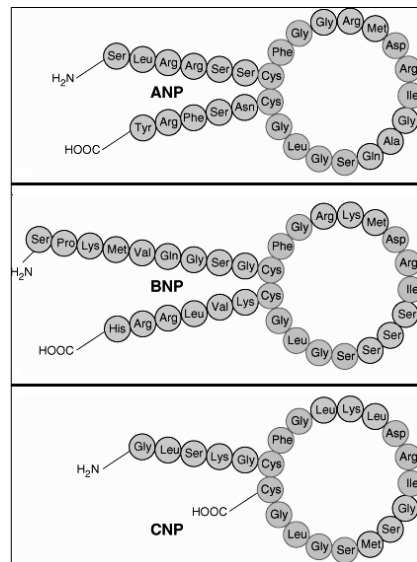
Durch diese Entdeckung wurde das Forschungsgebiet der Natriuretischen Peptide begründet [120]. Die NPs sind eine Peptidgruppe, welche eine wesentliche Rolle in der Steuerung und Homöostase renaler, kardiovaskulärer, endokriner und skelettaler Funktionen spielt [24, 98, 119, 120]. Das ANP wurde als erstes Mitglied dieser Hormonfamilie beschrieben und besitzt natriuretische, diuretische, vasorelaxierende und antimitogene Eigenschaften [24, 119].

Dieses Hormon wird v.a. bei vermehrter Volumenbelastung durch Dehnungsreize des Herzvorhofs ausgeschüttet und bewirkt u.a. über eine Hemmung des Renin-Angiotensin-Aldosteron Regelkreises eine forcierte Natriumausscheidung sowie eine Senkung des Blutdruckes durch Vasodilatation [119, 120].

In den Folgejahren wurden noch weitere Vertreter dieser Hormonfamilie gefunden, darunter das BNP (brain natriuretic peptide) und das CNP (C-type natriuretic peptide) [80, 143, 148]. ANP und BNP werden überwiegend im Herzen synthetisiert und zirkulieren im Plasma, während CNP größtenteils im Gefäßsystem zu finden ist und von Endothelzellen produziert wird [79]. BNP hat mittlerweile Einzug in den klinischen Alltag gefunden. Es kann als NTproBNP (N-terminales Spaltprodukt des Hormons) im Plasma von Patienten nachgewiesen werden und hat, einen hohen negativen prädiktiven Wert für das Fehlen einer enddiastolischen Druckerhöhung am Ventrikel. In diesem Zusammenhang kommt dem BNP in der Differenzialdiagnose von Dyspnoe und Herzinsuffizienz eine wichtige Rolle zu [90].

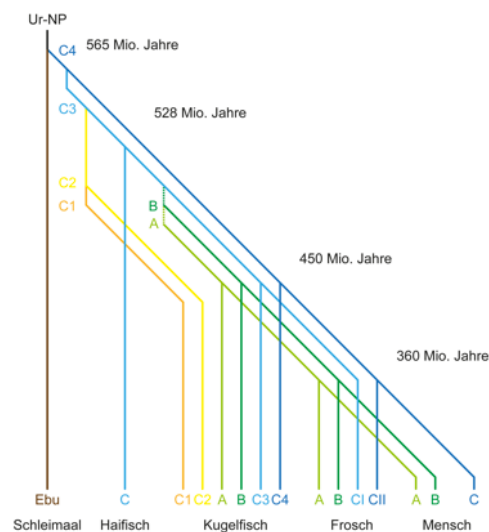
#### **1.4.2. Struktur und Biosynthese**

Das natriuretische Peptid Typ-C (CNP) wurde erstmals 1990 von Sudoh et al. identifiziert und ist entwicklungsgeschichtlich das älteste Mitglied der Familie der natriuretischen Peptide [66, 148]. Strukturell besteht CNP aus einem 17 Aminosäurering der durch eine Disulfidbrücke gebildet wird. Dieser Aminosäurering findet sich bei allen Natriuretischen Peptiden und ist essenziell für die Bindung an Rezeptoren verantwortlich (Abb. 1.) [140].



**Abbildung 2:** Struktur und Aminosäuresequenz der Natriuretischen Peptide

CNP scheint unter den Natriuretischen Peptiden das am längsten konservierte Protein zu sein und konnte auch in primitiven Lebensformen nachgewiesen werden [154]. Auch gibt es Untersuchungen, die darauf deuten, dass das CNP die Vorläuferform darstellt, aus der sich ANP und BNP entwickelt haben [66]. Aus Genomanalysen lässt sich die Evolution der natriuretischen Peptide wie in Abbildung 3. dargestellt rekonstruieren. Durch vergleichende Genanalysen konnte man herleiten, dass es während der Evolution der Fische zu einer Differenzierung innerhalb der natriuretischen Peptide kam, was am ehesten eine notwendige Veränderung widerspiegelt, welche bei der Adaptierung an verschiedene osmotische Umgebungsbedingungen notwendig wurde [66].



**Abbildung 3:** Evolution der Natriuretischen Peptide [Inoue et al. 2003]

---

Das CNP Gen ist auf Chromosom 2 lokalisiert und beinhaltet drei Exons und zwei Introns [124]. Nach der Abspaltung des Signalpeptides durch eine Signalpeptidase, wird das 126-aa prepro-CNP in das Propeptid umgewandelt. In dieser Form wird es als Pro-CNP gespeichert und anschließend durch das Enzym Furin gespalten wodurch CNP-53 entsteht [140, 158]. Furin ist eine ubiquitäre Proprotein Convertase die v.a. im Trans-Golgi Netzwerk vorhanden ist [172]. Dieses Peptid wird durch einen bisher ungeklärten Mechanismus in die aktive Form des 22-aa CNP umgewandelt. Das CNP-53 wird in menschlichen Endothelzellen gefunden, genauso wie im Hirngewebe von Schweinen und könnte ebenfalls eine spezifische neurophysiologische Funktion haben, die man bislang jedoch noch nicht im Detail entschlüsseln konnte [147]. CNP wird in hohem Maße im Gehirn und ebenfalls in peripherem Gewebe exprimiert, hierbei besonders in Endothelzellen des Gefäßsystems [147]. Während ANP und BNP als „cardiale natriuretische Peptide“ vorwiegend in Vorhöfen und Kammern des Herzens exprimiert werden, findet man dort nur geringe Konzentrationen von CNP [164]. Bei gesunden Individuen sind die Plasma CNP Konzentrationen typischerweise niedrig, in Endothelzellen dagegen ausgesprochen hoch [17, 65, 69]. Untersuchungen hierzu wurden von unserer Arbeitsgruppe durchgeführt, wobei gezeigt werden konnte, dass zur Bestimmung der CNP Spiegel im Blut NT-proCNP besser geeignet ist als CNP. Diese Tatsache beruht auf einer längeren biologischen Halbwertszeit des NT-proCNP [78].

Zusammenfassend führen diese Befunde zu der These, dass die Funktion des CNP eher einem autokrinen/parakrinen Mechanismus entspricht und nicht wie bei ANP und BNP einem endokrinen Wirkmechanismus [180].

### **1.4.3. Rezeptoren**

Mittlerweile konnten drei Typen von Rezeptoren identifiziert werden, die ganz spezifisch Natriuretische Peptide binden. Diese wurden beim Menschen als Natriuretic Peptide Rezeptor-1, -2 und -3 bezeichnet [113, 128]. Diese drei Rezeptor Untertypen bilden die Familie der natriuretischen Peptid Rezeptoren, auch wenn sie sich in der Spezifität der Ligandenbindung, sowie der transmembranen Signaltransduktion deutlich unterscheiden [118, 128, 139]. Die

---

allgemeine topologische Struktur von NPR-1 und NPR-2 besteht aus mindestens vier unterschiedlichen Domänen [113, 128]. Beide Rezeptortypen sind Transmembranproteine mit einer extrazellulär gelegenen Liganden bindenden Domäne, einem kurzen transmembranen Teil, welcher das Protein in zwei Hälften teilt und einem intrazellulären Bereich mit einer homologen regulatorischen Kinase, cGMP-dependent Kinase (cGK) und einer katalytischen Guanylyl-Cyclase (GC) an seinem C-terminalen Ende [3, 118, 128]. NPR-1 und NPR-2 sind sich strukturell sehr ähnlich, jedoch hat NPR-2 eine weitaus höhere Affinität für CNP, als für die anderen natriuretischen Peptide [31, 74]. Nach Bindung von CNP an den NPR-2 Rezeptor kommt es zu einer Aktivierung der Proteinkinase G (cGMP-dependent kinase (cGK)) über eine Erhöhung des intrazellulären cGMP Spiegels [118, 159]. Neben den beiden bereits erwähnten Rezeptoren existiert noch ein weiterer Rezeptor, der als NPR-3 Rezeptor bezeichnet wird. NPR-3 ist in der Lage die Aktivität der Protein Kinase A zu hemmen, indem es über eine  $G_i$ -protein abhängige Hemmung der Adenylatcyclase zu einem Abfall des cAMP-Spiegels kommt [3, 159].

NPR-3 bindet über seinen extrazellulär gelegenen Anteil alle drei natriuretischen Peptide, mit derselben Affinität und entfernt diese über Rezeptor vermittelte Endozytose aus der Blutzirkulation. Dadurch scheint NPR-3 einen modulatorischen Einfluss auf die Verfügbarkeit der Natriuretischen Peptide zu haben [3, 89]. NPR-1 ist die dominante Form der NP-Rezeptoren, wird in fast allen peripheren Organen exprimiert und ist für die meisten bekannten physiologischen Effekte von ANP und BNP verantwortlich [119]. NPR-2 dagegen wird überwiegend im Gehirn und Gewebe des Gefäßsystems exprimiert und scheint dort die Effekte von CNP zu modulieren [139].

Mittlerweile gibt es aber auch eindeutige Hinweise darauf, dass der NPR-3 Rezeptor mehr ist als nur ein sog. „Clearance“-Rezeptor. Sofern er mit CNP oder dem selektiven, synthetischen Liganden cANF<sup>4-23</sup> stimuliert wird kann dieser Rezeptor ebenfalls über ein  $G_i$ -Protein seine spezifische physiologische Wirkung entfalten [3].

Eine Aktivierung von NPR-3 führt ebenso zu einer Aktivitätssteigerung der Phospholipase-C (PLC) und damit zum Anstieg von  $IP_3$  und DAG.  $IP_3$  führt zu



einer Ausschüttung von Kalzium aus dem ER und spielt vor allem bei Stoffwechsel- und Exozytosevorgängen eine Rolle, während DAG die Proteinkinase-C aktiviert. Auch wurde beschrieben, dass NPR-3 zur Stimulierung von eNOS und Inhibition des MAP-Kinase Pathways führen kann, wodurch die Signaltransduktion diverser Wachstumsfaktoren (FGF, PDGF) sowie von Endothelin und Phorbol ester gehemmt werden kann [90].

In Betrachtung dessen hat NPR-3 durchaus Einfluss auf Zellwachstum, Zellproliferation und Differenzierung [122]. Die NPR-3 vermittelte Hemmung der Adenylat-Cyclase Aktivität, könnte des Weiteren ein Mechanismus sein, der in der Regulation der chronischen Hypertonie eine Rolle spielt [90]. Auch gibt es Hinweise, dass die NPR-3 vermittelte Inhibierung der Endothelinsekretion durch ANP eine Rolle in der Blutdruckregulation spielt [95, 122]. Versuche an NPR-3 Knockout Mäusen konnten zeigen, dass diese Tiere eine Neigung zu Hypertonie und eine verminderte Fähigkeit zur Harnkonzentrierung haben [95].

Rezeptor	Verteilung	Spezifität	Funktion	bei knock-out
NPR-1(A)	Arterien, Niere	ANP > BNP >> CNP	cGMP↑ Vasodilatation Diurese↑	Hypertonus, kardiale Hypertrophie, kardiale Fibrose, Testosteronmangel, Volumenüberladung
NPR-2(B)	VSMC, Gehirn, aktivierte ECs, Chondrozyten, Fibroblasten	CNP >> ANP > BNP	cGMP↑ Vasodilatation	Kleinwuchs, Epilepsieneigung, Unfruchtbarkeit
NPR-3(C)	nahezu ubiquitär	CNP > ANP, BNP	cAMP↓ Clearance	Hypotension gesteigerte Diurese Riesenwuchs Knochendeformitäten

**Tabelle 2.** Übersicht über Verteilung und Funktion der natriuretischen Peptid Rezeptoren [118, 139]

#### 1.4.4. Physiologische Bedeutung des CNP

Die relativ hohe Konzentration von CNP in Endothelzellen und die hohe Expression seines spezifischen Rezeptors NPR-2 auf den darunter liegenden glatten Muskelzellen, deutet darauf hin, dass dieses Peptid die Fähigkeit

---

besitzt, Einfluss auf den Gefäßtonus zu nehmen. In einer experimentellen Studie konnte gezeigt werden, dass eine lokale Infusion von CNP den Blutfluss in den Unterarmen von Probanden NO unabhängig, deutlich steigern konnte [62]. Mittlerweile konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden, dass exogen zugeführtes CNP sowohl bei menschlichen als auch tierischen Blutgefäßen als ein überaus potenter Vasodilatator fungiert [32, 145, 170]. Dieser Mechanismus variiert jedoch deutlich, je nach Größe der untersuchten Gefäße, was vermutlich die Heterogenität in der Expression der einzelnen NPR-Untergruppen widerspiegelt [140].

Der Nachweis, dass CNP, auch wenn nicht in größeren Mengen, in Endothelzellen gespeichert wird und die Fähigkeit besitzt über Hyperpolarisation eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur zu bewirken, hat zu der Ansicht geführt, dass es sich bei CNP um einen EDHF (endotelium-derived hyperpolarising factor) handelt [18]. Experimentelle Untersuchungen an kleinen Arterien deuteten darauf hin, dass klassische Endothel abhängige Dilatatoren, wie Acetylcholin (ACh) oder Bradykinin ihre relaxierende Wirkung zum Teil über die Freisetzung von CNP entfalten [18]. Es konnte kürzlich sogar gezeigt werden, dass ACh direkt die Freisetzung von CNP aus Endothelzellen stimuliert und damit die Relaxation von kleinen Arterien verursacht [18]. Dieser Vorgang ist mit einer Zell-Hyperpolarisation verbunden und wird über den NPR-3 Rezeptor vermittelt [32]. Hierbei kommt es zu einer NPR-3 vermittelten Aktivierung eines Kalium Kanals (GIRK), damit zum Kaliumefflux und schließlich zur Hyperpolarisation der Muskelzelle [163]. Diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass die CNP/NPR-3 Signal Transduktion ein wichtiger Bestandteil im Regulationssystem des peripheren Blutkreislaufes ist und das CNP als EDHF fungiert [140].

CNP führt nicht nur im arteriellen, sondern auch im venösen System zu einer Vasodilatation. Dieser Effekt wird ebenfalls über eine Hyperpolarisation glatter Muskelzellen ausgelöst. Allerdings scheint der zu Grunde liegende Mechanismus ein gänzlich anderer zu sein. Die Rezeptor Untergruppe über welche die Dilatation bewirkt wird, konnte bisher noch nicht charakterisiert werden. Für diesen Mechanismus ist nach neuestem Stand des Wissens eher der GC-NPR-2 Rezeptor verantwortlich. Interessanterweise ist die

---

Konzentration von CNP in den Endothelzellen des venösen System scheinbar höher, als im arteriellen Kreislauf, woraus man schließen könnte, dass CNP einen erheblichen Einfluss auf die Druckverhältnisse im venösen System haben muss [16, 140].

Dieser durchaus potente Einfluss auf den Gefäßtonus lässt darauf schließen, dass CNP auch die Fähigkeit besitzen könnte, direkt Einfluss auf den Blutdruck zu nehmen. In einer Studie mit mehr als 2000 japanischen Teilnehmern konnte gezeigt werden, dass ein Polymorphismus im menschlichen CNP Gen (G2628A) als Prädiktor für die Entstehung eines Bluthochdruckes angesehen werden kann. Deutlich wurde dies v.a. in Bezug auf die jungen Studienteilnehmer [117]. Anhand der CNP Plasma Konzentrationen lassen sich allerdings keine Aussagen, bzw. Nachweise bezüglich einer Hypertonie treffen [117, 140]. Dies ist allerdings nicht verwunderlich, da CNP außerordentlich schnell inaktiviert wird und seine Wirkung über einen parakrinen/autokrinen Mechanismus entfaltet [140]. Der Abbau des CNP findet zum Teil durch Nephylisin statt. Diese auch als Enkephalinase, CALLA, NEP oder CD10 bezeichnete Zink(II)-abhängige membrangebundene Endopeptidase ist an verschiedenen Prozessen von Signalpeptiden beteiligt und scheint auch bei der Entstehung des Bluthochdruckes eine maßgebliche Rolle zu spielen [68]. Auch wenn die Beziehung zwischen CNP und der Entstehung einer Hypertonie bislang nicht geklärt ist, so ist es doch bewiesen dass eine exogene i.v. Zufuhr von CNP zu einem deutlichen Abfall des Blutdruckes führen kann [65]. Dieser akute Blutdruck senkende Effekt hängt vermutlich mit dem bereits beschriebenen direkten Einfluss von CNP auf den Gefäßtonus zusammen [140].

Zusätzlich zu diesem direkten Einfluss auf den Gefäßtonus, verringert CNP ebenfalls die Ausdehnung von künstlich erzeugten Myokardinfarkten an isolierten Rattenherzen, indem es den Ischämie-Reperfusionsschaden am Herzen reduziert [61]. Eine Infusion von CNP entweder vor oder nach dem Ischämischen Infarkt ereignis führte in o.g. Studie zu einem 30-50 prozentigem Rückgang des Infarktes [61, 140]. Dieser Effekt auf das Gewebe wird von einer sich normalisierenden Pumpleistung und normalen koronaren Perfusionsdrücken begleitet. Vermutlich wird durch Mediatoren, wie Bradykinin

---

oder physikalische Kräfte (shear stress), denen das Herz während einer Ischämie-Reperfusion ausgesetzt ist, eine Freisetzung von CNP aus den Endothelzellen induziert um dort einen protektiven Effekt zu entfalten [61, 140].

Interessanterweise wurde in anderen Experimenten beobachtet, dass Hypoxie alleine zu einer gesteigerten Produktion und Freisetzung von CNP führt [61, 69, 140]. Diese Beobachtung kann als eine Art Kompensationsmechanismus gewertet werden welcher dazu dienen soll, die Gewebeschäden die durch eine Ischämie entstehen, von vornherein einzudämmen. Bei Patienten mit chronischen Herzfehlern wurden ebenfalls erhöhte Konzentrationen von CNP nachgewiesen, was unter Umständen einem ähnlichen protektiven Mechanismus entspricht [69].

Durch die hohe Konzentration von CNP in Endothelzellen des Gefäßsystems steht dieses an einer zentralen Stelle, um einen modulierenden Einfluss auf zirkulierende Blutzellen, v.a. Immunzellen, ausüben zu können. Darüber hinaus bewirkt eine inflammatorische Stimulation von Endothelzellen mittels IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  oder LPS eine vermehrte Freisetzung von CNP aus denselben [149]. Z.B. sind bei septischen Patienten die Plasmakonzentrationen von CNP signifikant gegenüber der Normalbevölkerung erhöht [54]. Dieser Befund spiegelt vielleicht die Beteiligung oder sogar die Verstärkung einer Entzündungsreaktion durch CNP wieder [54]. So konnte bereits 2002 nachgewiesen werden, dass CNP oder der NPR-3 Ligand cANF<sup>4-23</sup> die Produktion des proinflammatorischen Prostaglandin-E<sub>2</sub> in isolierten Zellen unterdrücken kann [70]. CNP scheint ebenfalls einen hemmenden Einfluss auf Leukozyten auszuüben, indem es das sogenannte Leukozyten-Rolling eindämmt [70, 140]. Dieser hemmende Effekt könnte dadurch zustande kommen, dass CNP die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, oder den Leukozyten selbst reduziert. In anderen experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass CNP die entzündungsbedingte neointimale Hyperplasie und damit die Stenosierung bzw. Restenosierung von Gefäßen signifikant verringern kann [79, 123]. Diese Beobachtung hat besonders für die interventionelle Rekanalisierung von atherosklerotisch stenosierten oder verschlossenen Gefäßen eine große Bedeutung. In einem Schweinmodell konnte gezeigt werden, dass CNP die

---

stenosierenden Umbauvorgänge (constrictive remodelling) nach Ballonangioplastie der Nierenarterien hemmen konnte, ohne dabei die Reendothelialisierung negativ zu beeinflussen [79].

Die antiinflammatorischen Fähigkeiten von CNP legen nahe, dass es eventuell auch einen protektiven Effekt auf die Entstehung von atherosklerotischen Läsionen haben könnte. Ein kausaler Zusammenhang konnte bislang jedoch noch nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise ist dieser positive Einfluss von CNP auf inflammatorische kardiovaskuläre Erkrankungen darauf zurückzuführen, dass CNP die Rekrutierung von Leukozyten hemmt [140]. Desweiteren kann CNP die Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen unterdrücken, nachdem diese durch oxLDL stimuliert wurden [123, 124].

All diese Befunde verdeutlichen den hohen klinischen Stellenwert der Erforschung der physiologischen Aufgaben des CNP zukommt. Klinische Anwendung könnte dieses Peptid u.a. bei Behandlungen von Restenosen nach Angioplastien sowie der Beschichtung von Stent-, bzw. Gefäßprothesen finden.

## **1.5. Ziele der Arbeit**

Ein großes Augenmerk der vorliegenden Arbeit lag darauf, inwieweit sich das physiologische und pathophysiologische Verhaltensmuster humaner Monozyten, Makrophagen und einer standardisierten leukämischen Zellreihe (THP-1-Zellen) unterscheiden. Auch sollte mit dieser Arbeit untersucht werden, ob sich THP-1 Zellen für die Erforschung von arteriosklerotischen Prozessen im Hinblick auf das CNP-System eignen.

LPS und oxidiertes LDL spielen im Rahmen von Entzündungsprozessen bzw. bei der Atherogenese eine bedeutende Rolle. Monozyten reagieren bei Stimulation mit LPS mit einer ausgeprägten Entzündungsantwort. Dieser Befund wurde schon durch eine Vielzahl von experimentellen Untersuchungen bestätigt. Als Vergleich zu dieser standardisierten provozierten Inflammation, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, ob und wie oben genannte

---

Immunzellen auf eine Stimulation mit oxidiertem LDL reagieren. Und ob auch hierbei eine inflammatorische Antwort der Zellen ausgelöst werden kann.

Ob CNP einen direkten Einfluss auf die physiologische und pathophysiologische Reaktion von Monozyten, bzw. Makrophagen hat, ist ein weiterer Gegenstand dieser wissenschaftlichen Arbeit. In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, ob eine Zellstimulation mit CNP eine durch LPS, bzw. oxLDL induzierte inflammatorische Antwort beeinflussen kann.

Als Pilotversuch wurden in der vorliegenden Arbeit Monozyten zu Makrophagen ausdifferenziert und die physiologischen, sowie pathophysiologischen Verhaltensmuster der Zellen untersucht. Auch hierbei wurden die Zellen mit LPS, oxLDL stimuliert und ein möglicher Einfluss von CNP auf diese provozierte inflammatorische Reaktion überprüft. Das Verhalten der ausdifferenzierten Zellen ist Gegenstand weiterführender aktueller Untersuchungen.

---

## 2. Material und Methoden

### 2.1.1. Geräte

Lichtmikroskop (Axioplan 2, Carl Zeiss AG, Deutschland).

Durchflusszytometer BD FACSCanto II ( BD Bioscience, San Jose, USA)

iCycler IQ 5<sup>TM</sup> (BioRad, München, Deutschland)

Photometer (Siemens, München, Deutschland)

Spektrophotometer (Tecan Scanner<sup>TM</sup>, Männedorf, Schweiz)

Pipetten (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland)

Thermomixer (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland)

Zentrifugen (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland)

### 2.1.2. Material

NH<sub>4</sub>-Heparinat Monovetten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

10 ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt, Deutschland)

50 ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt, Deutschland)

Leucosep<sup>TM</sup> Tubes (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland)

Messküvetten für Photometer (Sarstedt, Deutschland)

Zellkulturflaschen (PAA, Cölbe, Deutschland)

6-Well-Platten (PAA, Cölbe, Deutschland)

96-Well-PCR-Platten (Sarstedt, Deutschland)

Fuchs-Rosenthal Zählkammer (Laboroptik GmbH, Deutschland)

Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland)

---

## **2.1.3. Verwendete Chemikalien und Reagenzien**

### **2.1.3.1. Substanzen für die Zellkultivierung**

RMPI-1640 (1% L-Glutamin, 2% HEPES) (PAA, Cölbe, Deutschland)

Penicillin/Streptomycin (PAA, Cölbe, Deutschland)

### **2.1.3.2. Substanzen für die Isolierung von Monozyten**

Histopaque-1077 (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

PBS PH 7,4 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

### **2.1.3.3. Substanzen zur Stimulierung der Monozyten/Makrophagen**

M-CSF (Recombinant human M-CSF, R & D Systems Inc., Minneapolis USA)

LPS (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Oxidiertes LDL (Biomedical Technologies, Stoughton, USA)

C-Type natriuretic peptide (32-53) (Bachem AG, Bubendorf, Schweiz)

### **2.1.3.4. Primer**

GAPDH (QuantiTect Primer Assay, Qiagen, Hilden, Deutschland)

CNP (QuantiTect Primer Assay, Qiagen, Hilden, Deutschland)

NPR-2 (QuantiTect Primer Assay, Qiagen, Hilden, Deutschland)

NPR-3 (QuantiTect Primer Assay, Qiagen, Hilden, Deutschland)

TNF- $\alpha$  (QuantiTect Primer Assay, Qiagen, Hilden, Deutschland)

IL-1 $\beta$  (QuantiTect Primer Assay, Qiagen, Hilden, Deutschland)

IL-6 (QuantiTect Primer Assay, Qiagen, Hilden, Deutschland)

TGF- $\beta$  (QuantiTect Primer Assay, Qiagen, Hilden, Deutschland)



---

CD 14	(QuantiTect Primer Assay, Qiagen, Hilden, Deutschland)
CD 36	(QuantiTect Primer Assay, Qiagen, Hilden, Deutschland)
CD 68	(QuantiTect Primer Assay, Qiagen, Hilden, Deutschland)
MSR-1	(QuantiTect Primer Assay, Qiagen, Hilden, Deutschland)
TLR-4	(QuantiTect Primer Assay, Qiagen, Hilden, Deutschland)

### **2.1.3.5. Weitere Substanzen und Chemikalien**

MTT-Lösung (5 mg/ml) (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland)

EDTA (Sigma, Taufkirchen Deutschland)

Ethanol 100% zur Analyse (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)

Ethanol 70% vergällt (Institut für Pathologie, Klinikum rechts der Isar, München)

Paraformaldehyd (Formalin 4%) (Apotheke, Klinikum rechts der Isar)

anti-CD14 Fluoreszenzantikörper (BD Bioscience Pharminge, San Diego USA)

anti-CD16 Fluoreszenzantikörper (BD Bioscience Pharminge, San Diego USA)

anti-human CD14 Antikörper (Dako Denmark A/S, Golstrup, Dänemark)

anti-human CD68 Antikörper (Dako Denmark A/S, Golstrup, Dänemark)

Giemsa-Lösung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

May-Grünwald-Lösung (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)

Immunhistochemie Kit (Dako Denmark A/S, Golstrup, Dänemark)

peqGOLD Total RNA Kit (PEQLAB Biotech. GmbH Erlangen Deutschland)

DNase I Reaktionsmix (Quiagen, Hilden, Deutschland)

RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas Deutschland)

QuantiFast™ SYBR Green (Qiagen, Hilden, Deutschland)

Mayers Hämalalaun (Institut für Pathologie, Klinikum rechts der Isar, München)

---

PCR-Wasser (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)

Xylol (Institut für Pathologie, Klinikum rechts der Isar, München)

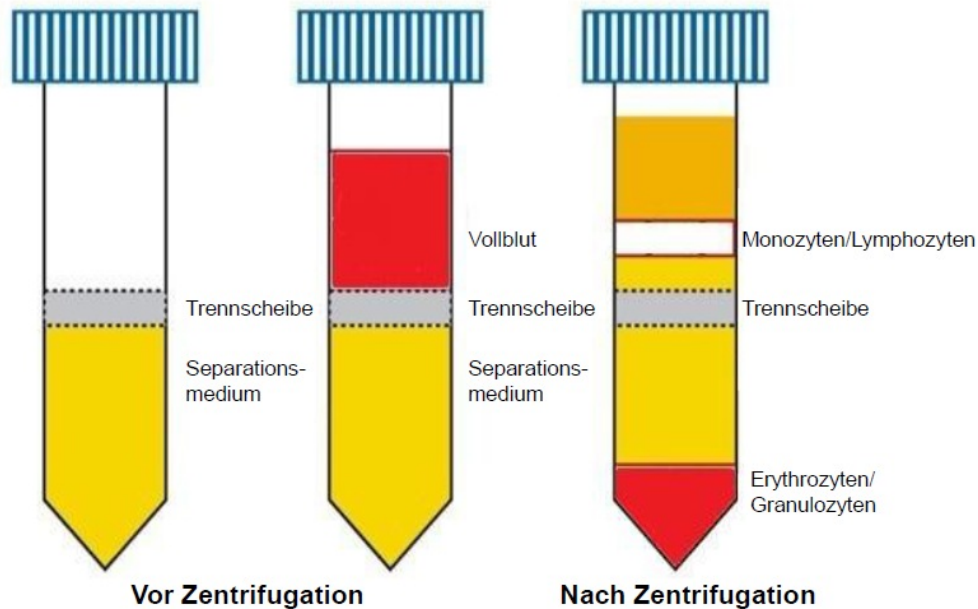
## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Isolierung und Kultivierung humaner Monozyten**

Humane Monozyten wurden separat (nicht gepoolt) aus dem Blut von drei gesunden Probanden isoliert. Alle Probanden waren männlichen Geschlechts und das mediane Lebensalter betrug zum Versuchszeitpunkt 33 Jahre. Die Isolierung der mononukleären Zellen aus dem Vollblut erfolgte mittels Zentrifugation in einem Dichtegradienten, wobei die Separation durch verschiedene Sedimentationsgeschwindigkeiten bzw. Dichten von Partikeln und Zellen in einer Flüssigkeit erreicht wird. Diese Separationsmethode beruht im Wesentlichen auf der Vorgehensweise von Böyum, die er bereits in den Jahren 1967 und 1968 beschrieben hat [22] und auch in mehreren aktuellen Studien Verwendung findet [22, 51, 87, 162, 178]. Als Separationsmedium wurde Histopaque-1077 (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) verwendet.

Das periphere venöse Blut der Spender wurde in NH<sub>4</sub>-Heparinat Monovetten (Sarstedt, Deutschland) entnommen, anschließend in 50 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert und im Verhältnis 1:1 mit PBS PH 7,4 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) verdünnt. Das verdünnte Blut wurde nun in Leucosep<sup>TM</sup> Tubes (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) überführt, welche zuvor mit 15 ml Separationsmedium Histopaque-1077 befüllt worden war. Die Leucosep<sup>TM</sup> Tubes sind mit einer porösen Trennscheibe aus Polyethylen ausgestattet, wodurch das zeitaufwändige Übersichten des Probenmaterials überflüssig wird. Im nächsten Schritt wurden die gefüllten Röhrchen 20 Minuten bei 1000 x g und Raumtemperatur im Ausschwingrotor ohne Bremse zentrifugiert. Während dieses Schrittes werden Lymphozyten und PBMCs aufgrund ihrer Dichte von unerwünschten Erythrozyten und

Granulozyten separiert und in einer Interphase zwischen Plasmafraktion und dem Separationsmedium angereichert.



**Abbildung 4:** Isolationschritte der Dichtegradientenzentrifugation.

Nach erfolgter Separation wird durch die Trennscheibe die Rekontamination der angereicherten Zellfraktion mit Erythrozyten und Granulozyten während der Entnahme vermieden.

Nach der Zentrifugation wurde die Plasmafraktion bis auf eine Schichtdicke von 10 mm über dem Buffy-Coat, einer zellulären Schicht überwiegend bestehend aus Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen, abgehoben und das gewonnene Plasma für die Herstellung von autologem Serum aufbewahrt. Die angereicherte Zellfraktion aus Lymphozyten und PBMCs wurde im nächsten Schritt aus den Leucosep<sup>TM</sup> Tubes direkt in frische 10 ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt, Deutschland) überführt. Dieses Plasma-Zell-Gemisch wurde nun 10 Minuten bei 400 x g zentrifugiert, der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, das Zellpellet in 10 ml PBS resuspendiert und anschließend erneut bei 400 x g abzentrifugiert.

Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurde das PBS vorsichtig abgesaugt und die Zellfraktion in 10 ml

---

Zellkulturmedium (RMPI-1640 1% L-Glutamin, 2% HEPES, 10 % autologes Serum 1% Penicillin/Streptomycin, PAA, Cölbe, Deutschland) resuspendiert. Die angereicherte Zellfraktion aus PBMCs und Lymphozyten wurde nach Bestimmung der Zellzahl in Zellkulturflaschen (PAA, Cölbe, Deutschland) ausgesät und für 12 Stunden bei 37°C inkubiert. Dieser Schritt ermöglichte die Adhäsion der PBMCs am Boden der Zellkulturflasche. Dies wiederum ermöglichte es im nächsten Schritt das Medium mit den nicht adhärenen anderen Zelltypen (z.B. Lymphozyten, verbliebene Granulozyten) abzusaugen und zu verwerfen. Die adhärenen Monozyten wurden mittels Zellschaber von dem Boden der Zellkulturflasche abgelöst, anschließend mit PBS gewaschen und für weitere Versuche ausgesät.

Die Reinheit der Monozytenpopulation wurde mittels FACS-Analyse (Anteil CD14 positiver Zellen) überprüft. Die nun erhaltenen Zellen wurden schließlich, je nach Versuchsansatz in oben beschriebenem Kulturmedium unter dem Zusatz verschiedener Substanzen und für einen unterschiedlich langen Zeitraum inkubiert. Auf die verschiedenen Versuchsansätze wird später im Detail eingegangen.

Grundsätzlich wurden die Monozyten unter standardisierten Bedingungen kultiviert. Als Kulturmedium wurde oben beschriebenes Zellkulturmedium verwendet (RMPI-1640 1% L-Glutamin, 2% HEPES, 10 % autologes Serum, 1% Penicillin/Streptomycin, PAA, Cölbe, Deutschland). Die Zellen wurden in 6-Well-Platten kultiviert, mit einer Anzahl von 750 000 Zellen pro Well.

### **2.2.2. Beschreibung und Kultivierung der THP-1 Zellen**

Im Jahre 1980 isolierte der japanische Wissenschaftler Shigeru Tsuchiya Monozyten aus dem Blut eines einjährigen Jungen, der an akuter myeloischer Leukämie erkrankt war [160]. Die daraus entstandene monozytäre Zelllinie wurde mit THP-1 bezeichnet. Diese Zellen weisen bestimmte Merkmale von gesunden humanen Monozyten auf, wie zum Beispiel die Fähigkeit zur Phagozytose, Differenzierungspotential zu Makrophagen, oder die Produktion von spezifischen Zytokinen [10, 37, 130]. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten und gewisser anderer Vorteile, wie z. B. homogenes DNA Profil, eine einfachere

---

Handhabung und Kultivierbarkeit, Lagerung, und Verfügbarkeit ist die THP-1 Zelllinie eine der meistgenutzten Zelllinien bei der Untersuchung molekularbiologischer, immunologischer Prozesse des Monozyten und Makrophagen Systems [10, 37, 130].

Die THP-1 Monozyten für die vorliegenden Versuchsreihen wurden aus eigenen Zellkultur Depots bezogen (ATCC® TIB-202 LGC Standards GmbH, Deutschland).

Die THP-1 Zellen wurden unter allgemein üblichen Zellkulturbedingungen kultiviert [10, 126, 130, 131]. Als Zellkulturmedium wurde RPMI-1640 verwendet unter den Zusatz von 10% FBS, 1% L-Glutamine, 1% Penicillin/Streptomycin [130, 160]. Die Kultivierung der THP-1 Zellen erfolgte ebenfalls in 6-Well-Platten, mit einer Zellzahl von 500 000 Zellen pro Well. Die Zellen wurden je nach Versuchsansatz für bestimmte Zeiträume mit LPS, oxLDL, M-CSF und CNP stimuliert. Eine detaillierte Versuchsbeschreibung wird in den nachfolgenden Kapiteln dargestellt.

### **2.2.3. Ausdifferenzierung von Monozyten zu Makrophagen**

Sowohl die humanen Monozyten, als auch die THP-1 Zellen wurden in Teilen dieser Versuchsreihe zu Makrophagen ausdifferenziert. Für beide Zelllinien wurde das jeweilige Standardmedium verwendet, unter dem Zusatz von M-CSF (Recombinant human M-CSF, R & D Systems Inc., Minneapolis USA). M-CSF auch CSF-1 genannt, ist ein natürliches Zytokin, welches für das Überleben, die Differenzierung und Proliferation von Makrophagen eine entscheidende Rolle spielt [34, 127]. Die Zellen wurden in 6-Well-Platten kultiviert, mit einer Zellzahl von 500 000 Zellen pro Well. Die Stimulation der Zellen mit dem rekombinanten Zytokin erfolgte für maximal 8 Tage, wobei nach 2, 4, 6 und 8 Tagen jeweils ein spezielles Expressionsprofil (s.u.) der Zellen mittels qPCR erstellt wurde. Des Weiteren wurden die nach sechs Tagen ausdifferenzierten Makrophagen anschließend für jeweils 48 Stunden mit LPS 0,05 µg/ml, OxLDL 50 µg/ml sowie CNP 10 µg/ml stimuliert und wiederum ein Expressionsprofil erstellt.

---

## 2.2.4. Charakterisierung der Monozyten/Makrophagen

### 2.2.4.1. FACS-Analyse

Die FACS-Analyse (Fluorescence activated cell sorting) Methode wird zur Charakterisierung von definierten Zellpopulationen, innerhalb eines Zellgemisches verwendet. Die Analysemethode beruht auf den Prinzipien der Durchflusszytometrie. Diese ist nichts anderes als ein optisches Messsystem, welches Streulicht und Fluoreszenzsignale von Partikeln, oder Zellen detektiert, analysiert, quantifiziert und graphisch aufarbeitet.

Die Zellen müssen sich zur Durchführung der Analyse in Suspension befinden und werden in einem Flüssigkeitsstrom nacheinander an einem Laserstrahl vorbei geleitet. Die beim Auftreffen des Lasers auf Partikel bzw. Zellen entstehenden Lichtbeugungen, Lichtstreuungen und emittierten Fluoreszenzen, werden von einem Detektor registriert, analysiert und gespeichert. Die hierbei entstehenden Signale, die sich sowohl in Qualität, als auch dem Fluoreszenzmuster unterscheiden, beruhen zum einen auf Zelleigenschaften, wie beispielsweise Faltung der Membran oder der Granularität der Zelle und zum anderen auf den Färbereigenschaften.

Die Zellen für die FACS-Analyse wurden nach oben beschriebenem Verfahren aus dem Vollblut isoliert und kultiviert. Für die Durchflusszytometrie wurden die Zellen vorbereitet, indem sie einmalig mit PBS gewaschen und anschließend fünf Minuten bei 500 x g abzentrifugiert wurden. Das nun erhaltene Zellpellet wurde in 1000 µl PBS resuspendiert. Schließlich wurde dem Zellgemisch 3000 µl Paraformaldehyd (Formalin 4%) zugegeben und die Suspension bei 4°C in Dunkelheit asserviert. Um spezifische Zellen in der Durchflusszytometrie detektieren zu können, müssen diese zuvor mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Antikörpern markiert werden.

Für die Durchführung der FACS-Analyse wurde der Durchflusszytometer BD FACSCanto II (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) verwendet. Zur Markierung und Identifikation der Monozytenpopulation wurden diese an anti-CD14 und anti-CD16 Fluoreszenzantikörpern (BD Bioscience Pharminge, San Diego, CA, USA) gekoppelt.

---

### **2.2.4.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Die HE Färbung ist eine histologische Methode, die der Darstellung von Zellen und Gewebe dient. Die Färbung wurde anhand eines etablierten, histologischen Standardprotokolls durchgeführt [11]. Hierfür wurden in Suspension befindliche Zellen abzentrifugiert und in 100 µl Formalin 4% resuspendiert. 10 µl der Zellsuspension wurden nun auf einen Objektträger aufgetragen und über Nacht getrocknet. Die trockenen Objektträger wurden am nächsten Tag mit Mayers Hämalaun für 10 Minuten inkubiert, anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen und schließlich für 5-10 Minuten in Leitungswasser gestellt. Im nächsten Schritt erfolgte für 40-60 Sekunden eine Inkubation mit 2%igem wässrigen Eosin. Im Anschluss wurden die Präparate erneut mit destilliertem Wasser gespült und schließlich in Xylol überführt und eingedeckt.

### **2.2.4.3. Immunhistochemische Färbungen**

Bei den immunhistochemischen Färbemethoden kann man grundsätzlich zwischen der direkten und der indirekten Markierung differenzieren. Die direkte Methode wurde bereits 1941 von Coons beschrieben [36].

Hierbei ist ein primärer Antikörper kovalent mit einem Fluoreszenzfarbstoff verknüpft. Dies macht es möglich, den markierten Antikörper in nur einem Arbeitsschritt auf ein Präparat aufzutragen, und dadurch das gewünschte Antigen markieren zu können. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt in seiner raschen Durchführbarkeit und dem Fehlen von Kreuzreaktionen, die relativ häufig beim Gebrauch eines sekundären Antikörpers auftreten.

Jedoch bindet bei dieser Methode nur ein direkt konjugierter Primärantikörper am Antigen, wodurch eine Signalverstärkung ausbleibt. Somit ist dieses Verfahren, im Vergleich zur indirekten Markierung etwas schwächer [91]. Aufgrund der fehlenden Signalverstärkung lassen sich durch das direkte Markierungsverfahren nur stark exprimierte Antigene sicher nachweisen [91].

Bei der indirekten Markierung wird ein unkonjugierter Primärantikörper benötigt, der an das Antigen bindet. Nachdem der primäre Antikörper an das Antigen gebunden hat werden sekundäre Antikörper hinzugegeben, die gegen den Fc-

---

Teil des Primärantikörper gerichtet sind. Diese Methode ist sensitiver als die direkte Markierung, da mehrere sekundäre Antikörper an den primären AK binden und es dadurch zu einer Signalverstärkung und somit einer verbesserten Visualisierung kommt [23].

Eine Weiterentwicklung dieses Verfahrens ist die Labelled-(Strept)-Avidin-Biotin-Methode (LSAB). Diese Färbemethode basiert auf der hohen Affinität von Streptavidin und Avidin (Hühnereiweiß) für Biotin. Sowohl Streptavidin als auch Avidin besitzen jeweils vier Bindungsstellen für Biotin.

In der vorliegenden Arbeit wandten wir die LSAB Markierungstechnik an. Sowohl Monozyten als auch Makrophagen wurden mit CD14 und CD68 (Dako Denmark A/S, Golstrup, Dänemark) Antikörpern markiert und die Ergebnisse fotografisch dokumentiert. Die Reagenzien wurden in folgender Reihenfolge auf die Präparate aufgetragen: Unkonjugierter Primärantikörper + biotinmarkierter Sekundärantikörper + Avidin-Biotin-Enzymkonjugat + Substrat/Chromogen → Farbe. Für die Färbung wurden Immunhistochemie Kits von Dako gemäß den Herstelleranweisungen verwendet (Dako Denmark A/S, Golstrup, Dänemark).

Die Auswertung der histologischen, sowie immunhistochemischen Präparate bezüglich der vorhandenen Zellfraktionen erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskop (Axioplan 2, Carl Zeiss AG, Deutschland). Für Übersichtsaufnahmen wurde die 1,25-2,5-fache Vergrößerung verwendet. Für detaillierte Ansichten wurde eine 10-, 20- und 40-fache Vergrößerung eingesetzt. Ausgewählte Präparate wurden schließlich fotografiert und beispielhaft für die einzelnen Färbemethoden im Ergebnisteil dargestellt.

#### **2.2.4.4. May-Grünwald-Giemsa-Färbung**

Die May-Grünwald-Giemsa-Färbung gestattet, ebenso wie die HE-Färbung keine exakte Charakterisierung von Zellen. Allerdings ist sie schneller, einfacher und billiger durchführbar und ermöglicht zumindest eine orientierende Einschätzung der vorliegenden Zellarten. Zur Durchführung der Färbung stehen mehrere kommerziell erhältliche Lösungen zu Verfügung. Jede dieser Lösungen beinhaltet einen basischen Farbstoff, wie z.B. Methylenblau und



---

einen anionischen Farbstoff, wie beispielsweise Eosin. Das Methylenblau verbindet sich hierbei mit negativ geladenen Bestandteilen des Zytoplasmas, bzw. des Zellkerns, wie Nukleinsäuren im Zellkern oder in Ribosomen und gibt diesen Zellbestandteilen eine blau bis violette Farbe. Eosin verbindet sich mit positiv geladenen Zellstrukturen, wie zytoplasmatischen Proteinen, was diesen eine rosa bis rote Farbe verleiht.

Die Zellen wurden, wie oben bereits beschrieben auf die Objektträger aufgetragen und fixiert. Nach Fixierung der Zellen auf dem Objektträger, wurden die Präparate mit May-Grünwald-Lösung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) für 10 Minuten inkubiert und anschließend 10 Mal in demineralisiertem Wasser gewaschen. Es folgte eine Inkubation in Giemsa Lösung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) für 10 Minuten und einem abschließendem Waschschrift. Anschließend wurden die Präparate unter dem Lichtmikroskop begutachtet.

### **2.2.5. Stimulierung der Monozyten/Makrophagen**

Sowohl die humanen Monozyten, als auch die THP-1 Zellreihe wurden mit LPS, oxLDL, sowie CNP inkubiert. Den Hauptversuchen wurde eine Testphase vorgeschaltet, in der die optimalen Konzentrationen von LPS, oxLDL und CNP bestimmt wurden.

Das Lipopolysaccharid (LPS) ist ein, auf humane Immunzellen, antigenwirksames Molekül, welches in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien enthalten ist. Beim Zerfall der Bakterien, und damit deren Zellwand werden diese zuckerhaltigen Moleküle freigesetzt und entfalten eine endotoxische Wirkung auf den Organismus. Gelangt LPS als Endotoxin in die Blutbahn, kann es dort an das im Serum zirkulierende Protein LBP (Lipopolysaccharid-bindendes-Protein) binden, wodurch sich ein Komplex bildet, der an den Membranrezeptor CD14 andocken kann [125, 172].

CD14 wird v.a. auf der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen exprimiert und induziert bei Bindung an LPS über NF- $\kappa$ B u.a. die Freisetzung von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  und löst somit eine Entzündungsreaktion aus [107, 126, 172].

---

Das für diese Versuchsreihe verwendete LPS (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) wurde aus *Escherichia coli* 0111:B4 extrahiert, durch Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) gereinigt und durch Bestrahlung mittels Gamma-Strahler sterilisiert.

Für die Stimulierungsversuche mit LPS wurden humane Monozyten, wie auch THP-1 Zellen in dem jeweiligen Standardmedium, in 6-Well-Platten ausgesät. Pro Well betrug die Zellzahl 750 000 Zellen. Jeweils vier Wells wurden mit einer LPS Konzentration von 0,01 µg/ml, 0,05 µg/ml sowie 0,1 µg/ml inkubiert. Diese Versuchsansätze wurden jeweils für die Zeitpunkte 12, 24 und 48 Stunden durchgeführt. Die THP-1 Zellen wurden mit einer LPS Konzentration von 0,1 µg/ml behandelt und für 24 Stunden inkubiert.

Die über 6 Tage mit M-CSF behandelten Makrophagen wurden mit einer LPS Konzentration von 0,05 µg/ml stimuliert und die Stimulationsdauer betrug für diesen Versuchsansatz 48 Stunden.

Das oxidierte LDL (#BT-910X Human Ox-LDL, Hi TBAR) wurde von Biomedical Technologies Stoughton, USA bezogen. Das humane LDL wurde mittels Ultrazentrifugation gereinigt und durch die Behandlung mit 3.5 µM CuSO<sub>4</sub> in PBS 37°C für 24 Stunden oxidiert.

Der Oxidationsprozess wurde durch die Zugabe von EDTA beendet und durch Gel-Elektrophorese überprüft. Hierbei wurde das oxidierte LDL gegen natives LDL aufgetragen. OxLDL wandert in der Gel-Elektrophorese 2,7-mal weiter als das native LDL, wodurch der erfolgreiche Oxidationsprozess nachgewiesen werden kann. Nach der Oxidation wurde das erhaltene Produkt über eine Membran gefiltert und aseptisch verpackt.

Für die Stimulierungsversuche mit oxidiertem LDL wurden die humanen Monozyten, die über 6 Tage mit M-CSF ausdifferenzierten Makrophagen, sowie die THP-1 in 6-Well-Platten und dem jeweiligen Standardmedium ausgesät. Die humanen Monozyten wurden für 12, 24 und 48 Stunden mit oxLDL stimuliert hierbei wurden die Zellen jeweils oxLDL Konzentrationen von 10 µg/ml, 50 µg/ml und 100 µg/ml ausgesetzt. Die über 6 Tage mit M-CSF ausdifferenzierten Makrophagen wurden für 48 Stunden mit einer oxLDL Konzentration von 50

---

µg/ml inkubiert. Die THP-Zellen wurden mit äquivalenter Konzentration für ebenfalls 48 Stunden bebrütet.

Die humanen Monozyten, wie auch die Zellen unter Stimulation mit M-CSF, LPS und oxLDL wurden mit CNP behandelt um zu prüfen, ob durch die Zugabe dieses Peptides Veränderungen im Expressionsprofil der Zellen erkennbar werden, bzw. CNP einen Einfluss auf das pathophysiologische und physiologische Verhalten der humanen Monozyten/Makrophagen hat.

Für diese Versuchsansätze wurde CNP, C-Type natriuretic peptide (32-53), von Bachem AG, Bubendorf, Schweiz, bezogen. Die humanen Monozyten wurden in 6-Well-Platten ausgesät mit 750 000 Zellen per Well und mit CNP Konzentrationen von 0,1 µg/ml, 1,0 µg/ml und 10 µg/ml behandelt.

Pro Konzentration wurden die Zellen für Zeiträume von 12, 24 und 48 Stunden inkubiert. In einem weiteren Versuchsansatz wurden Monozyten mit LPS 0,05 µg/ml + CNP 10 µg/ml für 24 Stunden bzw. OxLDL 50 µg/ml + CNP 10 µg/ml für 48 Stunden stimuliert. Der gleiche Versuchsansatz wurde mit über 6 Tage mit M-CSF ausdifferenzierten Makrophagen durchgeführt.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden humane Monozyten über 8 Tage mit CNP 10 µg/ml in Standardmedium sowie Standardmedium + M-CSF ausgesät und nach zwei, vier, sechs und acht Tagen eine Expressionsprofil erstellt. Auch hier wurden die Zellen in 6-Well-Platten zu jeweils 750 000 Zellen per Well ausgesät.

## **2.2.6. RNA-Isolierung**

Zur Isolierung der RNA aus Zellsuspensionen wurde das peqGOLD Total RNA Kit (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) verwendet. Die RNA aus humanen Monozyten und THP-1 Zellen wurde aus einem Zelllysat gewonnen.

Hierfür wurden die zu untersuchenden Zellen aus der jeweiligen Zellkulturflasche, bzw. Well samt Medium entnommen und bei 400 x g für fünf Minuten abzentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 400 µl Lysepuffer

---

resuspendiert. Das gewonnene Lysat wurde in eine sog. DNA Removing column gegeben und anschließend für eine Minute bei 12 000 x g zentrifugiert.

Der Säulendurchfluss wurde im nächsten Schritt mit 400 µl 70% Ethanol versetzt und vorsichtig vermischt. Anschließend wurde das Gemisch in eine PerfectBind RNA Column pipettiert und für eine Minute bei 10 000 x g zentrifugiert. Im folgenden Schritt wurde die RNA Column in einem frischen Zentrifugenröhrchen platziert, 500 µl RNA Waschpuffer I auf die RNA Column gegeben und für 15 Sekunden bei 10 000 x g zentrifugiert.

Um die Reinheit und Menge der bisher erhaltenen RNA zu erhalten wurde im Folgenden 75,0 µl DNase I Reaktionsmix (Quiagen, Hilden, Deutschland) auf die RNA Column gegeben. Der Reaktionsmix bestand aus 73,5 µl DNase I Digestion Buffer sowie 1,5 µl RNase-freie DNase (20 Kunitz units/µl). Der Reaktionsmix wurde direkt auf die Membran der PerfectBind RNA Column pipettiert und bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert.

In die RNA Column wurde im nächsten Schritt 400 µl RNA Waschpuffer I gegeben und die Säule inklusive Flüssigkeit bei Raumtemperatur für fünf Minuten inkubiert. Anschließend bei 10 000 x g für fünf Minuten zentrifugiert.

Es folgte ein weiterer Waschschrift. Hierbei wurden 600 µl des Waschpuffers II auf die RNA Bindungssäule pipettiert und für 15 Sekunden bei 10 000 x g durch die Bindungssäule zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde anschließend nochmals durchgeführt.

Zum Trocknen wurde die RNA Bindungssäule für zwei Minuten bei 10 000 x g zentrifugiert. Die Bindungssäule wurde danach in ein steriles 1,5 ml Zentrifugenröhrchen gestellt und die RNA durch die Zugabe von 50 µl 70 °C heißem, sterilen RNase freien dH<sub>2</sub>O, welches direkt auf die Membran der Column gegeben wurde, eluiert. Die Konzentration der erhaltenen RNA wurde photometrisch bestimmt. Die jeweiligen RNA Proben wurden für den weiteren Gebrauch bei -80 °C gelagert.

---

## 2.2.7. Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA

Um die Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren und damit RNA in einer Lösung zu bestimmen, kann diese photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm erfasst und gemessen werden. Für diese Messung müssen geeignet verdünnte Aliquots hergestellt werden. Hierfür wurden Messküvetten mit 99  $\mu$ l RNase freiem, sterilem Wasser befüllt und 1  $\mu$ l der zu untersuchenden Probe dazugegeben und sorgfältig vermischt. Der Grad der Absorption  $A$  bei einer Wellenlänge von 260 nm wird vom Photometer gemessen. Unter der Berücksichtigung, dass für  $A_{(260\text{nm})} = 1,0$  die Konzentration der RNA 40  $\mu\text{g/ml}$  beträgt, lässt sich daraus die RNA Konzentration der jeweiligen Probe errechnen.

Die Konzentration berechnet sich demnach wie folgt:

$$\text{RNA-Konzentration } (\mu\text{g/ml}) = \text{Absorption}_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Des Weiteren können mittels der photometrischen Messmethode Rückschlüsse auf den Reinheitsgrad der zu untersuchenden RNA Probe gezogen werden. Das bedeutet, dass Kontaminationen mit beispielsweise unerwünschten Proteinen in diesem Testverfahren detektiert werden können. Hierfür bildet man den Quotienten aus  $A_{(260\text{nm})}$  und  $A_{(280\text{nm})}$ . Das mit dem, für die RNA-Isolation, verwendeten Kit erzielbare  $A_{260/280}$  Verhältnis lag bei etwa 2,0, was einer Reinheit von näherungsweise 99,9 % entspricht.

## 2.2.8. cDNA-Synthese

Um die zelluläre Expressionsrate auf RNA Ebene analysieren zu können wurde aus der, wie oben beschrieben gewonnenen, RNA komplementäre DNA sog. cDNA synthetisiert. Diese einzelsträngige DNA benötigt man als Template für die Durchführung der quantitativen RT-PCR. Für die Synthese der cDNA wurde der RevertAid<sup>TM</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet.

---

Für die Synthese der cDNA wurde 1 µg RNA mit destilliertem, RNase freiem Wasser auf 11 µl aufgefüllt. Ein µl dT<sub>18</sub> wurde dazugegeben. Oligo(dT<sub>18</sub>) ist ein kurzes Oligonukleotid aus 18 Thymidinbasen, welche an die Poly-As der mRNA binden und dadurch als Primer die Startstelle für die reverse Transkription bilden. Dieser Mix wurde durch vorsichtiges Vortexen gemischt, kurz abzentrifugiert und anschließend bei 65°C für fünf Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben sofort für 2 Minuten auf Eis gelegt.

In der Zwischenzeit wurde ein Reaktionsmix vorbereitet, bestehend aus 4 µl Reaktionspuffer, 2 µl dNTP (10 mM), 1 µl RNase inhibitor sowie 1 µl M-MuLV (200 u/µl) Reverse Transkriptase. Auf jede Probe wurden 8 µl dieses Gemisches gegeben, die Proben wurden vorsichtig gemischt, abzentrifugiert und anschließend für eine Stunde bei 43°C inkubiert. Dieser Reaktionsvorgang wurde schließlich durch eine 5-Minütige Inkubation bei 70°C gestoppt. Die gewonnene cDNA mit einem Gesamtvolumen von 20 µl wurde entweder sofort für die PCR verwendet, oder für weitere Versuche bei -20°C gelagert [139].

### **2.2.9. quantitative RT-PCR**

Die Polymerase Kettenreaktion ist eines der am häufigsten angewandten experimentellen Verfahren in der modernen Molekularbiologie. Diese einfach und schnell durchführbare Methode dient dazu DNA und cDNA zu vervielfältigen. Hierbei reichen schon geringste Mengen DNA aus um das Vorkommen eines spezifischen Genes, bzw. die Expression eines bestimmten Gens nachzuweisen.

Durch eine zyklische Wiederholung erfolgt die Amplifikation einer bestimmten Gensequenz, hierbei dienen die synthetisierten DNA Produkte der vorhergehenden Zyklen, als Ausgangsstoffe für den nachfolgenden Zyklus. Dieser Mechanismus ermöglicht die exponentielle Vermehrung und damit den Nachweis und Expression einer spezifischen Gensequenz.

Die in dieser Versuchsbeschreibung verwendete quantitative RT-PCR ermöglicht über eine Fluoreszenz Messung, die während jedem PCR-Zyklus erfasst wird, die exakte Bestimmung der amplifizierten Menge an DNA. Hierbei nimmt das Fluoreszenzsignal proportional zu der Menge der amplifizierten

---

DNA-Produkte zu. Anhand der dadurch gewonnenen Fluoreszenzsignale kann in der exponentiellen Phase der PCR die Quantifizierung der erhaltenen PCR-Produkte erfolgen. Eine exakte und korrekte Quantifizierung ist ausnahmslos in der exponentiellen Phase der PCR möglich, da nur während dieser Phase optimale Reaktionsbedingungen vorherrschen.

Alle qPCR-Reaktionen wurden mit dem iCycler IQ 5<sup>TM</sup> (BioRad, München, Deutschland) unter der Verwendung von QuantiFast<sup>TM</sup> SYBR Green (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. SYBR Green ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der über die Bindung an doppelsträngige DNA zu deren Nachweis herangezogen werden kann. Hierbei lagert sich der SYBR Green Farbstoff in die DNA ein, wodurch sich die Fluoreszenz des Farbstoffes verstärkt. Eine Zunahme der Fluoreszenzsignale korreliert somit mit der Zunahme der zu amplifizierenden DNA Sequenzen [180].

Für jede PCR-Reaktion wurde ein Mix hergestellt mit einem Gesamtvolumen von 25 µl, bestehend aus 12,5 µl SYBR-Green, 8,0 µl PCR-Wasser (steril, destilliert), 2,5 µl Primer Assay (QuantiTect Primer Assay, Qiagen, Hilden, Deutschland) sowie 2,0 µl cDNA. Sämtliche PCR-Reaktionen wurden in speziellen 96-Well-PCR-Platten (Sarstedt, Deutschland) durchgeführt. Die PCR-Platten wurden vor dem Versuchsstart mit einer speziellen Klebefolie abgedeckt und versiegelt, um Kontaminationen zu vermeiden und die Lagerung der Versuchsproben zu ermöglichen.

Als Referenzgen wurde das house-keeping Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Ebenso wurde GAPDH als Referenz für die Normalisierung und damit Quantifizierung der anderen Gene verwendet. GAPDH ist ein Enzym der Glykolyse, dessen Gen unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen in jeder Zelle des menschlichen Körpers gleichmäßig exprimiert wird und dadurch auch regelhaft und zuverlässig nachweisbar ist [142]. Die Normalisierung auf dieses Genprodukt ermöglicht erst die Durchführung eines relativen Mengenvergleichs. Jedoch ist es auch in der qRT-PCR nicht möglich die absoluten Mengen an DNA zu messen.

Die Normalisierung auf GAPDH errechnet sich wie folgt:

---

$$\Delta CP = CP (\text{Zielgen}) - CP (\text{Kontrollgen GAPDH})$$

Je nach Versuchsansatz wurden die Expressionslevel von CNP, NPR-2, NPR-3, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , CD14, CD36, CD68, MSR-1 sowie TLR-4 bestimmt. Hierfür wurden spezifische oligonukleotid Primer (QuantiTect Primer Assay, Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Die PCR Reaktionen wurden unter folgenden Konditionen durchgeführt:

- Inkubation für 5 Minuten bei 95°C
- Gefolgt von 45 Zyklen bestehend aus:
  - 10 Sekunden bei 95°C
  - 30 Sekunden bei 60°C
  - 10 Sekunden bei 72°C

Während des letzten Schrittes erfolgte durch das PCR Detektionssystem die Messung der PCR Amplifikationen, anhand einer quantitativen Analyse der emittierten Fluoreszenz.

## **2.2.10. Vitalitätstest – MTT**

Um die optimale Zellzahl für die oben beschriebenen Versuche zu ermitteln wurde ein Vitalitätstest mit MTT durchgeführt. Für die Versuche wurden sowohl humane Monozyten, als auch THP-1 Zellen verwendet.

Dieses nicht radioaktive Testverfahren wurde erstmals 1983 von Mossman beschrieben [108]. Dieses Messverfahren wird angewandt um die Zellproliferation unter dem Einfluss von zytotoxischen Substanzen, Zytokinen, Nährstoffen, oder auch bestimmten Wachstumsfaktoren zu bestimmen. Ebenfalls kann es dazu verwendet werden die Vitalität, sowie den Aktivitätszustand von Zellen zu messen. MTT, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl Tetrazolium Bromid, ist ein gelbliches Salz welches durch metabolisch aktive Zellen, d.h. nur lebende Zellen, zu purpurfarbenen Formazan Kristallen umgewandelt werden kann. Je höher die Mitochondrien Dichte in den Zellen ist,



---

desto mehr MTT wird in schwerlösliche purpurfarbene Formazan Kristalle umgewandelt.

Da MTT, wie oben bereits erwähnt nur in lebenden, metabolisch aktiven Zellen auftritt, kann durch die Messung ein direkter Rückschluss auf den Vitalitätsgrad der Zellen gezogen werden. Die Anzahl des Formazans wird schließlich durch einen Spektrophotometer gemessen.

Die zu untersuchenden Zellen wurde hierbei in einer 96-Well-Platte nach Protokoll behandelt und in 100 µl Medium ausgesät. Mit einer Zellzahl von entweder 0, 5000, 10000, 20000, 40000 Zellen pro Well. Am Tag der Vitalitätsmessung wurde die 96-Well-Platte aus dem Brutschrank herausgenommen und 10 µl MTT-Lösung (5 mg/ml) (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) zu jedem Well gegeben, mit einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml MTT pro Well. Anschließend wurde die Platte für 4 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden 100 µl Stopplösung (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) zu jeder Probe hinzugegeben und die Platte über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Platten für fünf Minuten auf einem Schüttler bei 150 Hertz bewegt und anschließend für 3 Minuten bei 37°C im Wärmeschrank bebrütet. Schließlich wurde die Klarheit der Lösung überprüft. Die Messung erfolgte schließlich mit einem Spektrophotometer (Tecan Scanner™, Männedorf, Schweiz) bei einer Wellenlänge von 590 nm.

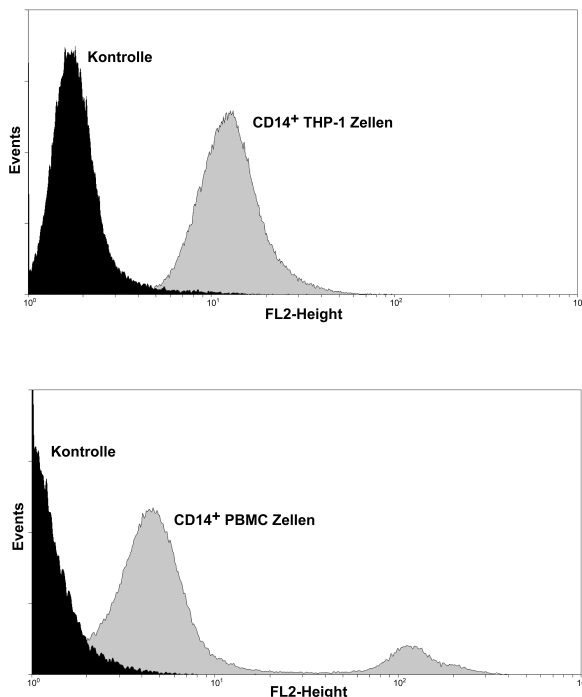
## **2.2.11. Statistische Auswertung und Analysemethoden**

Zur statistischen Analyse der gewonnenen Daten wurde die Statistiksoftware SPSS 15 (IBM Corporation, New York, USA), sowie MedCalc® for Windows, Version 10.0.1.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgien) verwendet. Alle statistischen Tests wurden mit einem Signifikanzniveau von 5% durchgeführt ( $p < 0,05$ ). Zum Vergleich der Mittelwerte zweier oder mehrerer Gruppen wurde der t-Test bzw. eine Einfaktorielle-ANOVA durchgeführt. Bei nicht normalverteilten Daten wurde stattdessen der robustere Mann-Whitney-U Test bzw. der Kruskal-Wallis Test angewandt. Das 95% Konfidenz Intervall, des NPR2/NPR-3 Verhältnisses wurde nach Rinne et al. berechnet [135].

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Optimierung der Monozytenisolierung

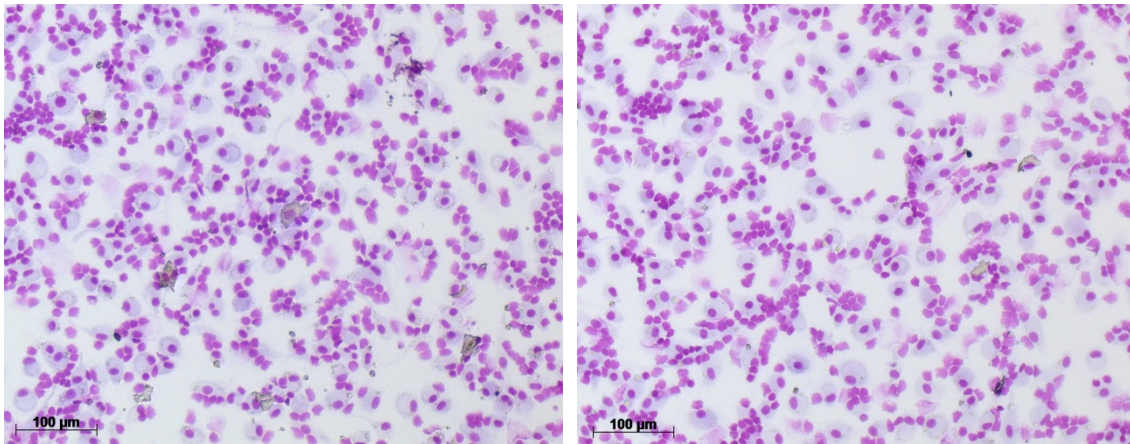
Die Ausbeute an CD14<sup>+</sup> und CD16<sup>+</sup> Zellen in der Fraktion humaner PBMC wurde mittels FACS-Analyse ermittelt. Diese betrug für CD14<sup>+</sup> Zellen im Durchschnitt 73,1%, beziehungsweise 14,6% für CD16<sup>+</sup> Zellen. Zum Vergleich wurde diese Analyse ebenfalls mit THP-1 Zellen durchgeführt (siehe Abb. 5). Hier betrug der Anteil CD14<sup>+</sup> Zellen im Durchschnitt 76,7%, für CD16<sup>+</sup> THP-1 Zellen wurde ein durchschnittlicher Prozentsatz von 7,9% gemessen. Außerdem wurde die Zahl der isolierten Zellen, direkt nach der Isolation, sowie vor dem Aussähen mittels Fuchs-Rosenthal Zählkammer erfasst.



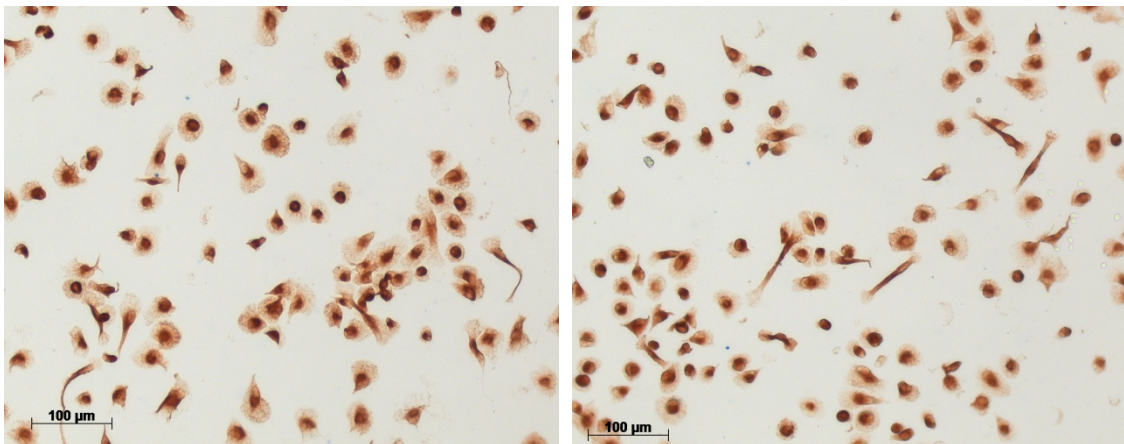
**Abbildung 5:** FACS Analyse der verwendeten THP-1 Zellen (oben) sowie der aus peripherem Blut gewonnenen Monozyten (unten).

Wie oben bereits beschrieben wurden mehrere Färbemethoden durchgeführt, um die isolierten Zellen darzustellen und eventuelle deren Charakterisierung anhand immunhistochemischer Färbemethoden vornehmen zu können. Anhand der immunhistochemischen Färbungen wurden die Oberflächeneigenschaften der Zellen genutzt, wobei Antikörper gegen die CD14 und CD68 Rezeptoren der PBMCs genutzt wurden um diese identifizieren zu können. Des Weiteren

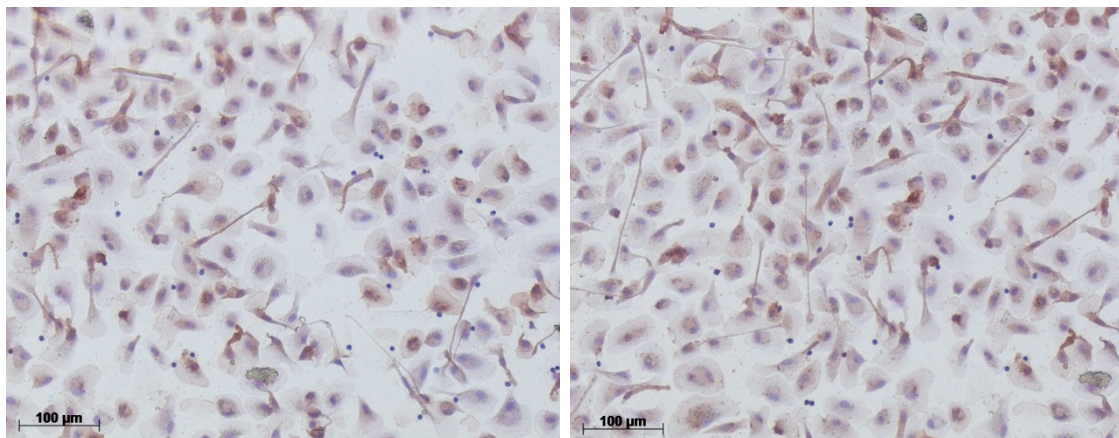
wurden Färbungen nach May-Grünwald-Giemsa, sowie HE-Färbungen durchgeführt.



**Abbildungen 6 und 7:** Isolierte Zellen nach May-Grünwald-Giemsa gefärbt.



**Abbildung 8 und 9:** immunhistochem. Färbungen mit CD68, Tag 4 nach Isolierung.



**Abbildung 10 und 11:** immunhistochem. Färbungen mit CD 14, Tag 6 nach Isolierung.

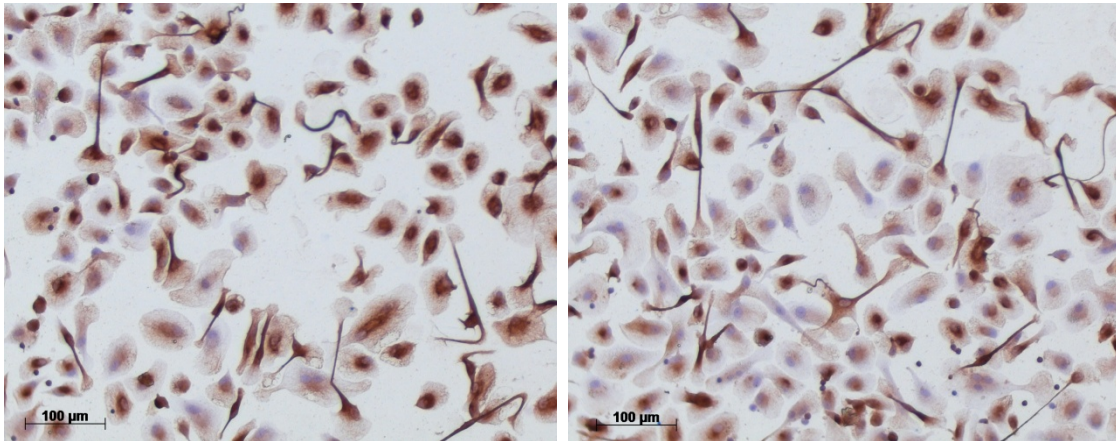


Abbildung 12 und 13: Immunhistochem. Färbungen mit CD68, Tag 6 nach Isolierung.

## 3.2. Physiologische und pathophysiologische Reaktion der THP-1 Zellen und PBMC

### 3.2.1. Vergleich des Grundexpressionsprofils von THP-1 Zellen mit PBMC

Gen	Basisexpressionslevels		
	PBMC	THP-1	PBMC /THP-1
<b>CNP</b>	$1.468 \times 10^{-2}$	$1.800 \times 10^{-4}$	82*
<b>NPR2</b>	$5.843 \times 10^{-3}$	$6.203 \times 10^{-5}$	94*
<b>NPR3</b>	$7.811 \times 10^{-4}$	$1.176 \times 10^{-6}$	664*
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	$8.607 \times 10^{-2}$	$1.638 \times 10^{-2}$	5*
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	$1.329 \times 10^{-1}$	$8.363 \times 10^{-4}$	159*
<b>IL-6</b>	$1.141 \times 10^{-3}$	$4.875 \times 10^{-6}$	234*
<b>CD14</b>	1.663	$3.808 \times 10^{-4}$	4368*
<b>CD68</b>	3.060	$1.393 \times 10^{-2}$	220*

**Tabelle 3:** Vergleich der Expressionslevels in humanen, peripheren, monozytären Zellen (PCMO) und THP-1 Zellen. Alle Expressionslevels sind auf GAPDH normalisiert. \*= $p < 0,05$

---

Tabelle 3 gibt einen Überblick über die Basisexpressionslevels von PBMCs und THP-1 Zellen. Hierbei fällt auf, dass in PBMCs alle gemessenen Gene signifikant höher exprimiert werden, als in THP-1 Zellen.

Die Reaktionen der THP-1 Zellen, sowie der primären humanen Monozyten wurde anhand der quantitativen Expression folgender Gene gemessen: CNP, NPR-2, NPR-3, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-6, CD14 sowie CD68. Die Expressionslevel der Zellen wurden bei diesem Versuchsansatz nach der Isolation, bestimmt. Hierbei wurden die Zellen in Standardmedium, ohne Zusatz weiterer Substanzen inkubiert.

Hierbei kann im Einzelnen beobachtet werden, dass CD14 und CD68 in THP-1 Zellen signifikant schwächer exprimiert werden als in humanen Monozyten. Dieser Unterschied ist bei CD14 am größten (Tabelle 3).

Wie in der Tabelle gezeigt werden kann, werden die Gene von CNP, NPR-2 und NPR3 in THP-1 Zellen signifikant schwächer exprimiert als in humanen Monozyten

Wie die Tabelle ebenfalls aufzeigt werden auch TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 in THP-1 Zellen signifikant schwächer exprimiert als in humanen Monozyten. Der Unterschied ist bei TNF- $\alpha$  jedoch marginal. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sämtliche Gene in THP-1 Zellen deutlich schwächer exprimiert werden, als in primären humanen Monozyten.

### **3.2.2. Vergleich der Reaktion von THP-1 Zellen und PBMC auf Stimulation mit LPS (24h) und oxLDL (48h)**

LPS führte in PBMC zu einer Steigerung der Expressionsraten aller Gene. Diese Änderungen waren für CNP, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, CD14 und CD68 statistisch signifikant. LPS führte in THP-1 Zellen nur bei IL-6 zu einer signifikanten Steigerung der Expressionsrate. Die Stimulierung der Zellen mit oxLDL führte in PBMC zu divergierenden Effekten als in THP-1 Zellen. Während es in PBMC tendenziell zu einem Abfall der Expressionsraten kam, welche allerdings nur für NPR3 statistisch signifikant war, führte oxLDL in THP-

1 Zellen zu einem signifikanten Anstieg von NPR3, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, CD14 und CD68, sowie zu einem signifikanten Abfall der Expressionsraten von NPR2. Eine Übersicht hierzu gibt Tabelle 4. Sowie die Abbildungen 14 und 15.

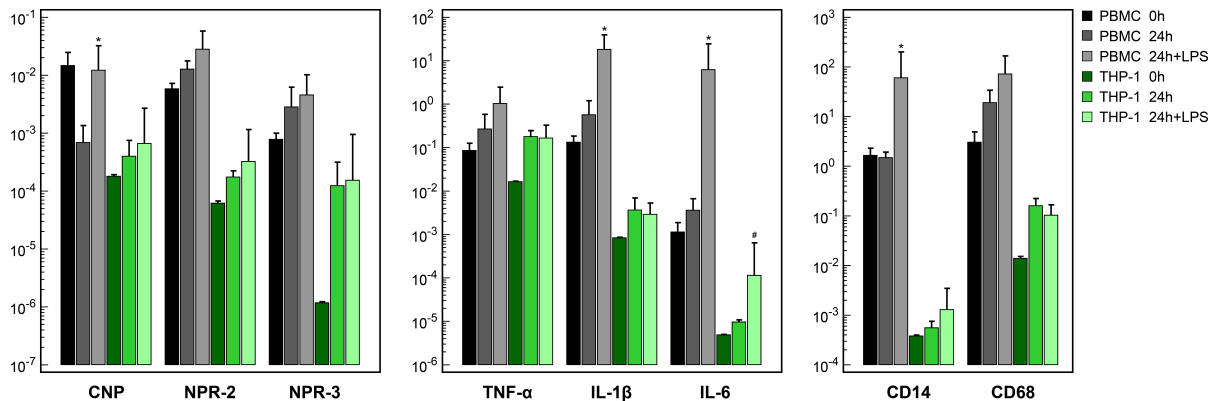
Gene	Einfluss von LPS (24h)		Einfluss von oxLDL (48h)	
	hMo	THP-1	hMo	THP-1
<b>CNP</b>	17.7* p=0.045	1.66 p=0.840	0.37 p=0.207	1.52 p=0.057
<b>NPR2</b>	2.20 p=0.167	1.86 p=0.486	0.86 p=0.700	0.26* p=0.007
<b>NPR3</b>	1.61 p=0.116	1.24 p=0.686	0.20* p=0.002	16.9* p=0.023
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	3.84 p=0.209	0.92 p=0.343	0.67 p=0.350	8.66* p=0.007
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	31.8* p<0.001	0.79 p=0.886	0.57 p=0.056	68.3* p=0.007
<b>IL-6</b>	1718* p<0.001	12.0* p=0.007	0.37 p=0.084	113* p=0.007
<b>CD14</b>	41.0* p=0.006	2.31 p=0.232	0.52 p=0.160	29.3* p=0.007
<b>CD68</b>	3.77 p=0.454	0.64 p=0.343	0.87 p=0.876	4.38* p=0.010

**Tabelle 4:** Verhältnis der Genexpression von Zellen in Standardmedium, im Vergleich zu Zellen unter Stimulation mit LPS, bzw. oxLDL. Alle Expressionslevel wurden auf GAPDH normalisiert.

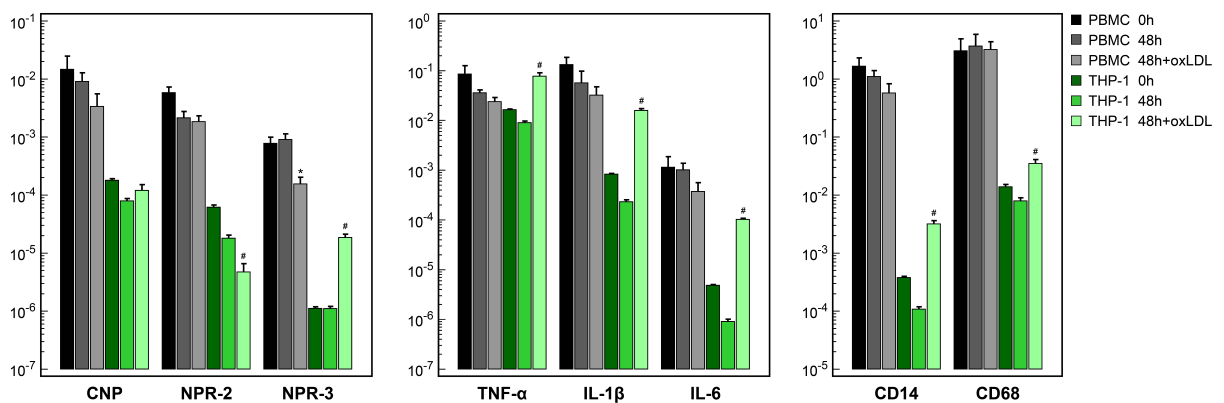
Eine Stimulation der THP-1 Zellen mit LPS verändert die oben angegebenen Expressionsstärken nach 24 Stunden wie folgt: bei CD68 kommt es zu keiner



Änderung, CNP, NPR-2, NPR-3 werden geringfügig herunter reguliert, das selbe konnte für TNF- $\alpha$  sowie IL-1 $\beta$  beobachtet werden. Wogegen es bei IL-6 zu einer verstärkten Expression kam und somit eine Hochregulation der Expression beobachtet werden konnte. Einen zusammenfassenden Überblick über die beschriebenen Ergebnisse bietet hierzu Abbildung 14.



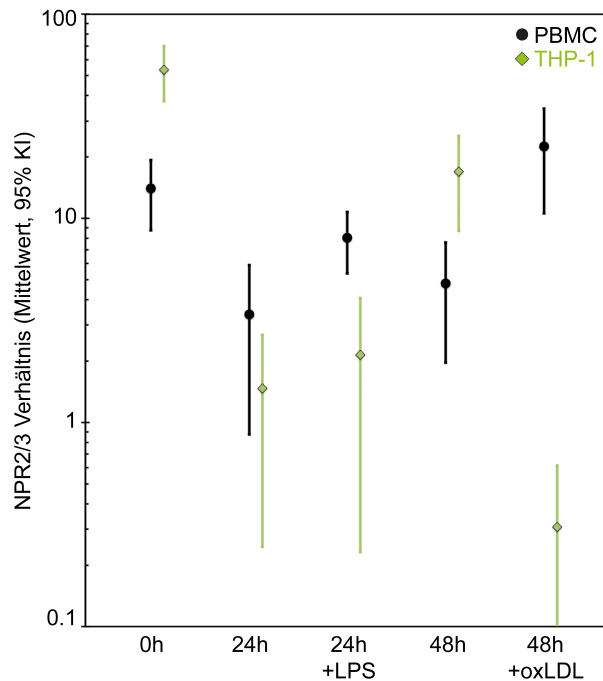
**Abbildung 14:** Darstellung der Stärke der Genexpression der einzelnen Gene kurz nach Isolierung (baseline) und nach 24 Stunden in Monozyten (PBMC) und THP-1 Zellen. Die jeweiligen Säulen 3 (hellgrau) und 6 (hellgrün) bilden den Effekt von LPS ab. LPS=0,05 $\mu$ g/ $\mu$ l Lipopolysaccharid, \*= $p$ <0,05 verglichen mit hMo zum Zeitpunkt 24h, #= $p$ <0,05 verglichen mit THP-1 Zellen zum Zeitpunkt 24h.



**Abbildung 15:** Darstellung der Stärke der Genexpression der einzelnen Gene kurz nach Isolierung (baseline) und nach 48 Stunden in Monozyten (hMo) und THP-1 Zellen. Die jeweiligen Säulen 3 (hellgrau) und 6 (hellgrün) stellen den Effekt von oxLDL dar. oxLDL=50 $\mu$ g/ $\mu$ l humanes oxidiertes LDL, \*= $p$ <0,05 verglichen mit PBMC zum Zeitpunkt 48h, #= $p$ <0,05 verglichen mit THP-1 Zellen zum Zeitpunkt 48h.

Durch eine Stimulation von THP-1 Zellen mit oxLDL über 48 Stunden veränderte sich die Expression der Gene wie folgt: Bei CD14, CD 68 konnte eine Hochregulation der Gene beobachtet werden. Bei CNP konnte keine statistisch signifikante Änderung der Expression beobachtet werden. Bezüglich

den Natriuretischen Peptid Rezeptoren kam es bei NPR-2 zu einer verminderten Expression und bei NPR-3 zu einer verstärkten Expression. Die inflammatorischen Parameter TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  sowie IL-6 wurden durch die Stimulation mit oxLDL hochreguliert.



**Abbildung 16:** NPR2/NPR3 Ratio in humanen Monozyten und THP-1 Zellen (median, 95% Konfidenzintervall) unter dem Einfluss von LPS und oxLDL.

Im Vergleich zur Kultivierung mit Standardmedium führte die Stimulation über 24 Stunden mit LPS in einer Dosierung von 0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bei primären humanen Monozyten zu einer Hochregulation von CD14, im Gegensatz dazu kam es bei CD68 zu einer Herabregulation (siehe Abb. 14). Keine Änderung der Genexpression konnte bei CNP und NPR-2 beobachtet werden. Bei NPR-3 kam es zu einer gesteigerten Genexpression. Bezüglich der inflammatorischen Parameter konnte bei IL-1 $\beta$  keine Veränderungen der Genexpression, im Vergleich zur Kultivierung im Standardmedium beobachtet werden. Bei TNF- $\alpha$  kam es zu einer Verminderung der Expressionslevel. Im Gegensatz dazu kam es zu einer Hochregulation von IL-6. Einen Überblick bietet Abbildung 14.

Im Vergleich zur Kultivierung mit Standardmedium führte die Stimulation der primären humanen Monozyten mit oxLDL, in einer Dosierung von 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  nach 48 Stunden zu einer Herabregulation von CD14, wogegen bei CD68 keine statistisch signifikanten Veränderungen der Expressionslevel beobachtet

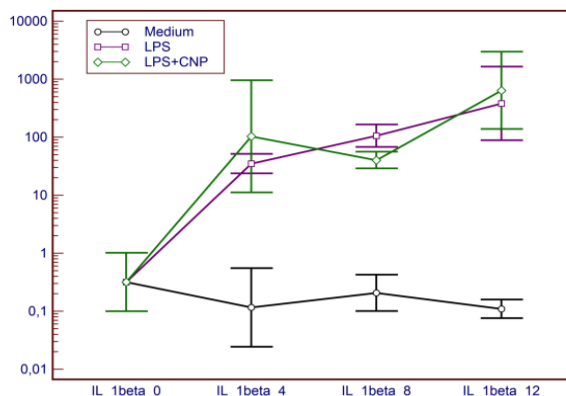


werden konnten In Bezug auf das CNP System kam es zu einer Verminderten Expression von CNP sowie NPR-3, bei NPR-2 konnten keine statistisch signifikanten Änderungen der Genexpression registriert werden. Bei den inflammatorischen Genen kam es bei TNF- $\alpha$  zu einer Herabregulation, dieselbe Beobachtung konnte für IL-6 gemacht werden. In Bezug auf IL-1 $\beta$  konnte keine statistisch signifikante Veränderung der Genexpression nachgewiesen werden.

### 3.2.3. Einfluss von CNP auf die LPS induzierte Reaktion

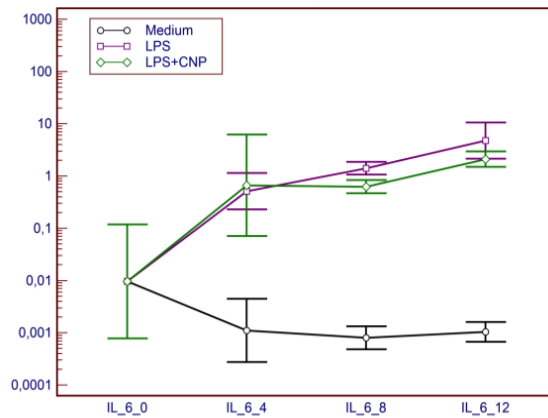
#### 3.2.3.1. Kurzfristiger Einfluss von CNP auf die LPS induzierte Reaktion (0, 4, 8, 12 Stunden)

CNP in einer Dosierung von 10  $\mu\text{g/ml}$  hatte keinen signifikanten Einfluss auf die frühe Überexpression der inflammatorischen Marker TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 in primären humanen Monozyten, nachdem diese für 0, 4, 8 sowie 12 Stunden mit LPS in einer Dosierung von 0,1  $\mu\text{g/ml}$  stimuliert wurden (Abb. 17-19).



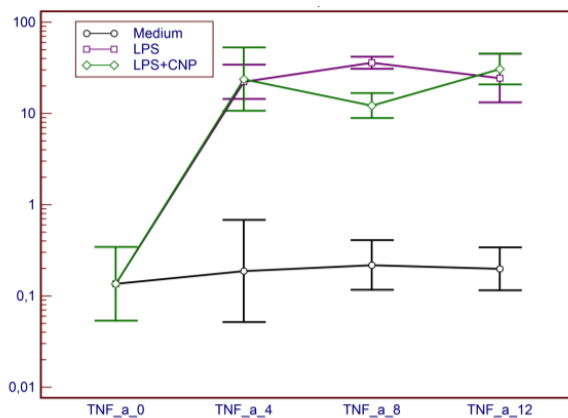
Humane Monzyten  
Stimulation mit LPS für 4/8/12h  
+ Zugabe von CNP 10 $\mu\text{g/ml}$

**Abbildung 17:** Expression von IL-1 $\beta$  unter dem Einfluss von LPS, CNP + LPS und Standardmedium zu den Beobachtungszeitpunkten 0, 4, 8 und 12 Stunden



Humane Monozyten  
Stimulation mit LPS für 4/8/12h  
+ Zugabe von CNP 10µg/ml

**Abbildung 18:** Expression von IL-6 unter dem Einfluss von LPS, CNP + LPS und Standardmedium zu den Beobachtungszeitpunkten 0, 4, 8 und 12 Stunden



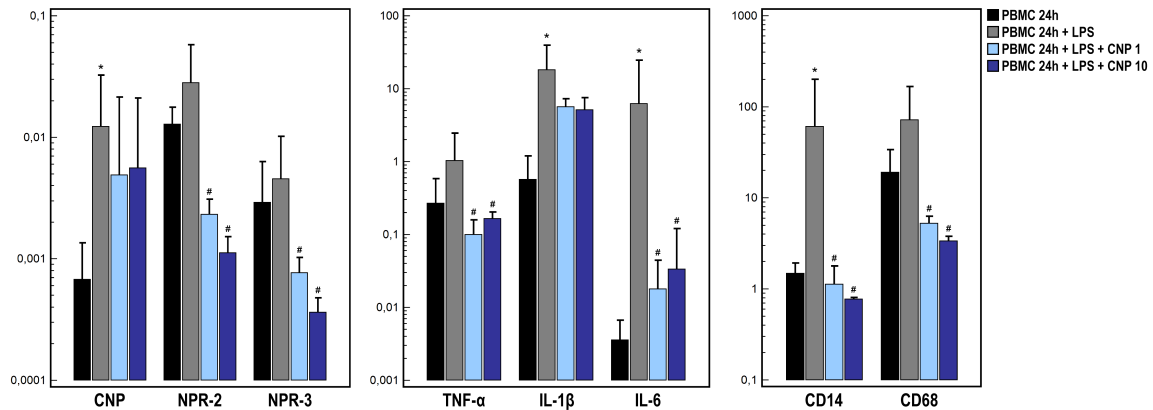
Humane Monozyten  
Stimulation mit LPS für 4/8/12h  
+ Zugabe von CNP 10µg/ml

**Abbildung 19:** Expression von TNF-α unter dem Einfluss von LPS, CNP + LPS und Standardmedium zu den Beobachtungszeitpunkten 0, 4, 8 und 12 Stunden.

### 3.2.3.2. Langfristiger Einfluss von CNP auf die LPS induzierte Reaktion (24h)

CNP, in einer Dosierung von 1 µg/ml, neutralisiert die LPS (0,1 µg/ml) induzierte Überexpression bestimmter Gene in PBMC. Dieser Effekt kann für die Expression folgender Gene beobachtet werden: NPR-2, NPR-3, TNF-α,

CD14 und CD68 (siehe Abb. 20). Des Weiteren reduziert CNP in einer Dosierung von 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  statistisch signifikant, die LPS induzierte Überexpression der inflammatorischen Genen IL-1 $\beta$  sowie IL-6. Nur auf die Expression seines eigenen Gens hat CNP keinen Einfluss (siehe Abb. 20).



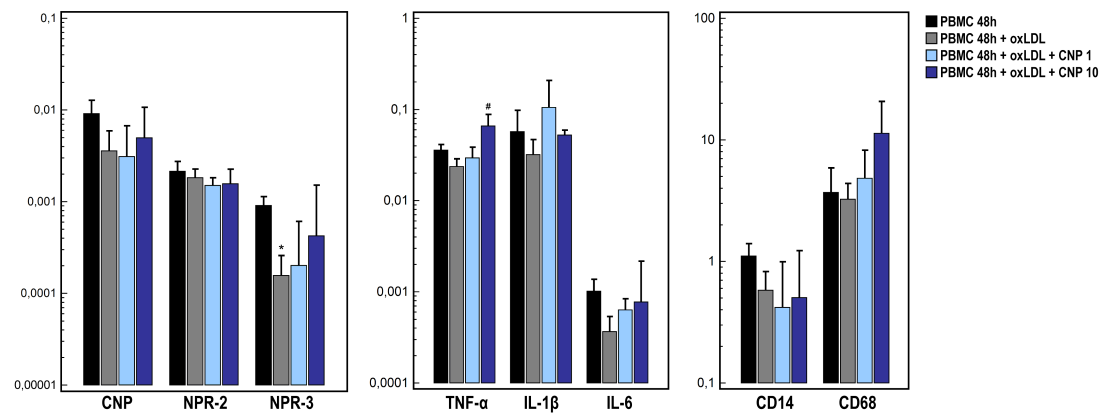
**Abbildung 20:** Einfluss von CNP auf die LPS induzierten Änderungen der Genexpression (normalisiert auf GAPDH, means $\pm$ SEM). hMo=humane Monozyten, LPS=0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  LPS, CNP1=1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , CNP10=10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , \*=p<0.05 Verglichen mit hMo 24h (schwarze Säulen), #=p<0.05 verglichen mit hMo 24h + LPS (lila Säulen).

Abgesehen von den natriuretischen Peptidrezeptoren NPR-2 und NPR-3 hat die Dosissteigerung von CNP, von 1 auf 10  $\mu\text{g}$  keinen Einfluss auf die Expression der gemessenen Gene (siehe Abb. 20).

### 3.2.4. Einfluss von CNP auf die oxLDL induzierte Reaktion (48h)

CNP in einer Dosierung von 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bzw. 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  hat einen Einfluss auf die Genexpression primärer humaner Monozyten, nach 48 Stunden Stimulation mit oxLDL in einer Dosierung von 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Hierbei konnte bei der Expression von CNP kein statistisch signifikanter Einfluss beobachtet werden. Das Selbe gilt für NPR-2. CNP in einer Dosierung von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$  hat keinen Einfluss auf die Expression von NPR-3 (Abb. 21). Bei einer Dosissteigerung von CNP auf 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  kam es jedoch zu einer Hochregulation von NPR-3 (siehe Abbildung 21).



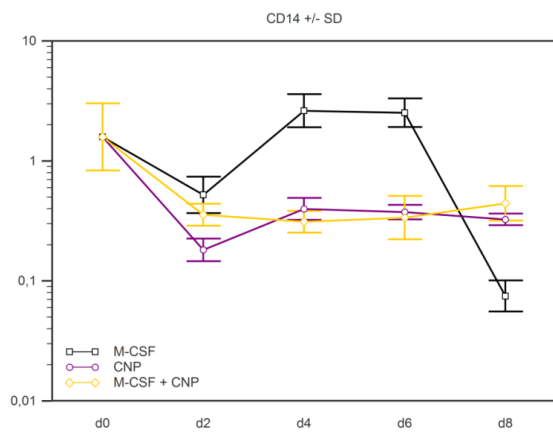
**Abbildung 21:** Einfluss von CNP auf die oxLDL induzierten Veränderungen der Genexpression (normalisiert auf die GAPDH Expression, means±SEM). hMo=humane Monozyten, oxLDL=50µg/µl human oxidized LDL, CNP1=1µg/µl, CNP10=10µg/µl, \*=p<0.05 Verglichen mit hMo 48h (schwarze Säulen), #=p<0.05 verglichen mit hMo 48h + oxLDL (lila Säulen).

Die Expression von TNF- $\alpha$  wurde durch die zusätzliche Stimulation mit CNP, in einer Dosis von 10 µg/ml, hochreguliert. Einen Einfluss auf die Expression von IL-1 $\beta$  konnte für CNP nur in einer Dosis von 1µg/ml beobachtet werden. Hierbei kam es zu einer Hochregulation (Abb. 21). Auf die Expression von IL-6 konnte kein statistisch signifikanter Einfluss beobachtet werden, ebenso auf die Expression von CD14. Bei CD68 kam es Dosis abhängig zu einer Expressionssteigerung. Bei TGF- $\beta$  konnte nur für CNP in einer Dosis von 10 µg/ml eine Hochregulation beobachtet werden (Abb. 21).

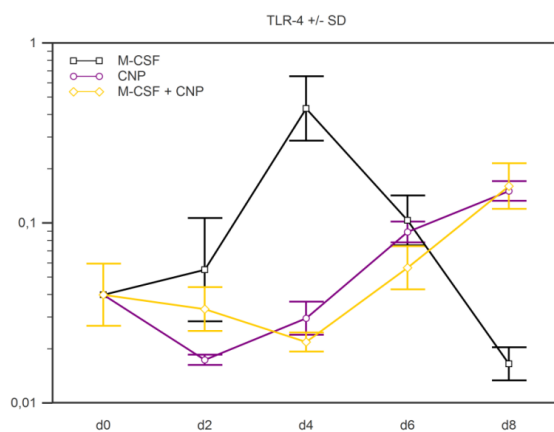
### 3.3. Pilotversuch zum Einfluss von CNP auf das Expressionsprofil während der Ausdifferenzierung humaner Monozyten zu Makrophagen

Für diese Versuchsreihe wurde die Expression folgender Gene bestimmt: CNP, NPR-2, NPR-3, TLR-4, MSR-1, CD14, CD36 sowie CD68. Die PBMCs wurden in diesem Versuchsansatz über acht Tage unter dem Einfluss von M-CSF bzw. CNP ausdifferenziert. Die CNP Konzentration betrug bei diesem Versuchsansatz 10 µg/ml. Diese Versuchsreihe erfolgte als Pilotversuch für weiterführende Studien. Hierbei konnte beobachtet werden, dass CNP die

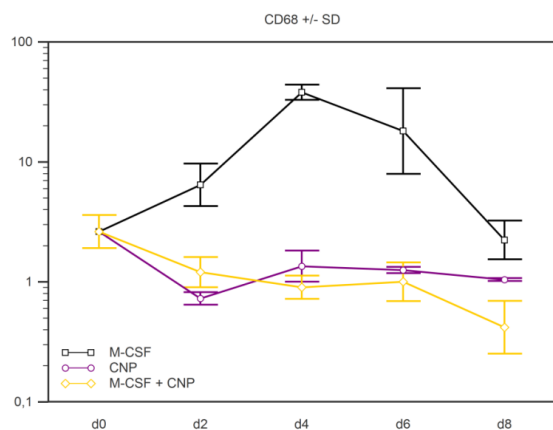
Überexpression von CD14 und CD68 verhindert (siehe Abb. 22 und 24).



**Abbildung 22:** Expression von CD 14 unter dem Einfluss von CNP, M-CSF sowie CNP + M-CSF zu den Beobachtungszeitpunkten Tag 0, 2, 4, 6 und 8.

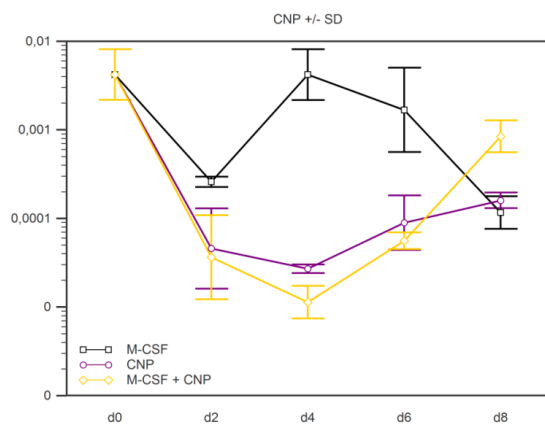


**Abbildung 23:** Expression von TLR-4 unter dem Einfluss von CNP, M-CSF sowie CNP + M-CSF zu den Beobachtungszeitpunkten Tag 0, 2, 4, 6 und 8.

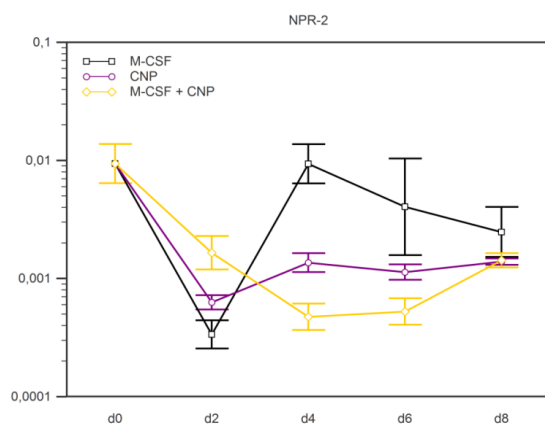


**Abbildung 24:** Expression von CD 68 unter dem Einfluss von CNP, M-CSF sowie CNP + M-CSF zu den Beobachtungszeitpunkten Tag 0, 2, 4, 6 und 8.

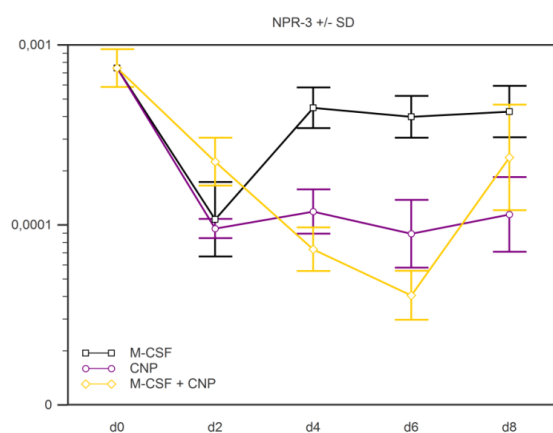
Ebenso wird die Überexpression von TLR-4 verhindert bzw. verzögert (Abb. 23).



**Abbildung 25:** Expression von CNP unter dem Einfluss von CNP, M-CSF sowie CNP + M-CSF zu den Beobachtungszeitpunkten Tag 0, 2, 4, 6 und 8.

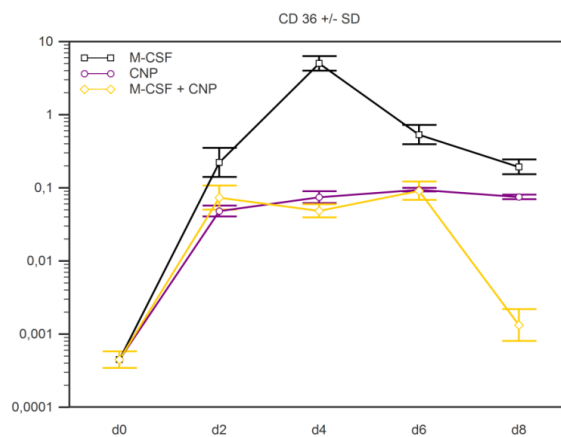


**Abbildung 26:** Expression von NPR-2 unter dem Einfluss von CNP, M-CSF sowie CNP + M-CSF zu den Beobachtungszeitpunkten Tag 0, 2, 4, 6 und 8.

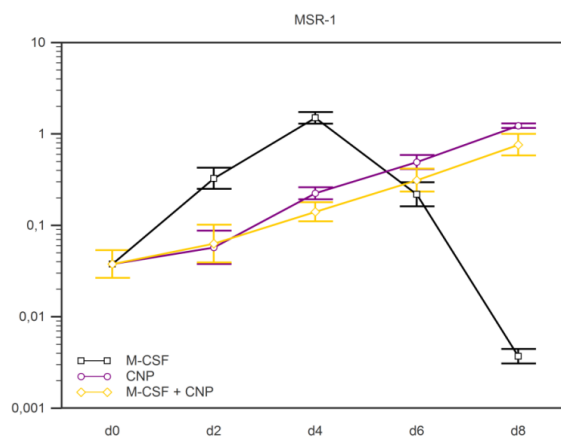


**Abbildung 27:** Expression von NPR-3 unter dem Einfluss von CNP, M-CSF sowie CNP + M-CSF zu den Beobachtungszeitpunkten Tag 0, 2, 4, 6 und 8.

CNP verzögert ebenfalls die anfängliche Herunterregulierung der Genexpression von CNP, NPR-2 und NPR-3, wie in den Abbildungen 25-27 dargestellt. Extrapoliert man hierbei die Verlaufskurven der Abbildungen 25-27, beträgt die Verzögerung der M-CSF Reaktion ca. 4 Tage.



**Abbildung 28:** Expression von CD 36 unter dem Einfluss von CNP, M-CSF sowie CNP + M-CSF zu den Beobachtungszeitpunkten Tag 0, 2, 4, 6 und 8.



**Abbildung 29:** Expression von MSR-1 unter dem Einfluss von CNP, M-CSF sowie CNP + M-CSF zu den Beobachtungszeitpunkten Tag 0, 2, 4, 6 und 8.

Wie in der Abbildung 28 dargestellt dämpft CNP die Überexpression von CD36. Auch führt die Stimulation durch CNP zu einer verzögerten Überexpression von MSR-1 (siehe hierzu Abb. 29).

---

## 4. Diskussion

### 4.1. Einführung

Zur Untersuchung der physiologischen und pathophysiologischen Funktionen humaner Monozyten, werden THP-1 Zellen weltweit als Standardzelllinie verwendet [130]. Darüber hinaus werden THP-1 Zellen ebenfalls zur Erforschung von pathophysiologischen Mechanismen in der Entstehung der Atherosklerose herangezogen [92, 93, 174]. Wie Qin et al. in einem umfangreichen Review Artikel zeigen konnten, eignen sich THP-1 Zellen, als Modell, zur Erforschung von Funktionen und Mechanismen von humanen Monozyten und Makrophagen im kardiovaskulären System [130]. Man darf dennoch nicht außer Acht lassen, dass es zwischen THP-1 Zellen und primären humanen Monozyten signifikante Unterschiede gibt [130]. Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass THP-1 Zellen, sich im Hinblick auf die LPS- und oxLDL-induzierten Änderungen im Expressionsmuster bestimmter Gene von humanen PBMCs unterscheiden.

Ein weiterer Unterschied zeigt sich darin, dass die Basisexpression aller analysierten Gene in humanen PBMCs signifikant höher ist, als in der THP-1 Zelllinie. Dieser Unterschied könnte hauptsächlich darauf zurückzuführen sein, dass die THP-1 Zellen eine Sonderform der Monozyten darstellen, die wie oben bereits beschrieben, aus einer akut leukämischen Zelllinie hervorgegangen sind [160]. THP-1 Zellen sind eine Zelllinie, welche unter günstigen Bedingungen kultiviert, unendlich lange überleben kann. Primäre humane Monozyten dagegen, sind weitaus schwieriger zu kultivieren und benötigen eine Stimulation durch Zytokine, um sie längerfristig in Kultur halten zu können. Diese Unterschiede zwischen THP-1 Zellen und primären humanen Monozyten sind bereits seit der Etablierung der THP-1 Zelllinie im wissenschaftlichen Bewusstsein und wurden von Qin et. al in einem Review Artikel bereits ausführlich diskutiert [130].

Die Reinheit der PBMCs, die durch, die in dieser Arbeit verwendete Isolierungsmethode erreicht wurde, lag zwischen 70,3% und 75,5%. Diese



---

Resultate stimmen mit Reinheitsgraden aus diversen früheren Veröffentlichungen überein (64-98%) [39, 51, 87].

Die Isolierung humaner Monozyten unter Verwendung der Dichtegradienten Zentrifugation ist eine gut etablierte [51] und vergleichsweise kostengünstige Methode [51], z.B. im Vergleich mit einer Isolierungsmethode mittels sogenannter magnetic beads. Letztgenannte Methode hat den Vorteil, dass sie zu einem deutlich höheren Reinheitsgrad der isolierten Monozyten führt [39]. Ein Nachteil ist jedoch darin zu sehen, dass der sogenannte magnetic bead Komplex, welcher an spezifische Oberflächen Rezeptoren von Monozyten bindet, meist nicht von den isolierten Zellen entfernt werden kann. Dies kann zu falschen und fehlerhaften Ergebnissen führen, wenn man Untersuchungen oder Experimente durchführt, welche auf den Oberflächenmerkmalen und Rezeptoren der betroffenen Zellen fundieren. Eine verbesserte Methode verwendet die sog. Negativselektion. Hierbei können die unerwünschten Zellen über spezifische magnetisierbare Polystyren-Partikel gebunden und unter Verwendung eines Magneten aus der Zellsuspension abgetrennt werden [111]. Leider stand diese Methode in unserem Labor nicht zur Verfügung.

## **4.2. Einfluss von oxLDL und LPS auf CNP und seine Rezeptoren**

Im Hinblick auf oxidiertes Low density Lipoprotein gab es bislang nur eine Studie, in der der Einfluss von oxLDL auf die Expression und Sekretion von CNP untersucht wurde. Diese experimentelle in Vitro Studie wurde an Endothelzellen vom Rind durchgeführt [150]. Hinzu kommt, dass die Expressionslevel von NPR-2 und NPR-3 bisher noch nicht in experimentellen Studien bestimmt wurden, auch in der letztgenannten Studie nicht. In dieser Untersuchung von Sugiyama et al. konnte gezeigt werden, dass oxidiertes LDL, in Konzentrationen von 50 µg/ml, die Sekretionslevel von CNP über 24 Stunden um 31% senkt. In der hier vorliegenden Arbeit führte oxLDL ebenfalls zu einer Reduktion der CNP Sekretion, bzw. der genomischen Expression. Wie aus Abbildung 15 zu entnehmen ist, betrug diese Reduktion 63 %, nach 48 Stunden Stimulation mit oxLDL.

---

Mitte des Jahres 2011, besprachen Sellitti et al. in einem Übersichtsartikel die bisher verfügbaren Veröffentlichungen, die sich mit der Regulation der CNP Expression auseinander gesetzt haben [141]. Sie identifizierten hierbei zwei Studien, die sich mit der Regulation von CNP und Änderungen des CNP Expressionslevels unter dem Einfluss von LPS beschäftigt haben.

In der ersten Studie wurden Versuche durchgeführt, bei denen unter Stimulation mit LPS die CNP mRNA Spiegel in Maus Makrophagen, auf das 300-fache Niveau des Ausgangswertes anstiegen [165]. In der zweiten Veröffentlichung wurden zwei Makrophagen-Zellreihen (THP-1 Zellen und HL-60-Zellen) mit LPS stimuliert [77]. Hierbei zeigten sich für beide Zellreihen inkonsistente Effekte auf die CNP Sekretion unter Stimulation mit LPS. Hinzu kommt, dass in dieser Studie kein Einfluss von LPS auf die CNP Sekretion und Expression primärer humaner Monozyten/Makrophagen nachgewiesen werden konnte.

Obwohl das Zellkultur Modell in den oben genannten Studien vergleichbar mit dem in dieser Arbeit beschriebenen methodischen Vorgehen ist, v.a. im Hinblick auf die verwendeten Zellreihen, die Isolierungsmethode der primären humanen Monozyten und die Stimulation mit LPS 0,1 µg/ml, weisen die Versuchsergebnisse trotzdem deutliche Unterschiede auf. So beispielsweise wenn man die kumulative Sekretion des CNP-Peptides nach 40 Stunden mit dem Expressionslevel der CNP mRNA nach 24 Stunden Stimulation mit LPS vergleicht.

Zusätzlich zum Review von Sellitti und Mitarbeitern konnten zwei weitere Studien ausfindig gemacht werden, die sich mit dem Einfluss von LPS auf die CNP Sekretion, bzw. Expression beschäftigt haben [105, 149]. In der Arbeit von Suga et al. konnte gezeigt werden, dass LPS in Endothelzellen von Rindern eine CNP Sekretion induziert. In der Studie von Miyoshi et al. wurde die Expression und Sekretion von CNP im Hypothalamus von Ratten gesteigert, indem man in tierexperimentellen Versuchen, einen Septischen Schock durch die Verabreichung von LPS bei den Tieren induziert hatte.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die vorliegende Arbeit, nach aktuellem Stand des Wissens, zum ersten Mal aufzeigen konnte, dass die Expression von CNP und seiner Rezeptoren NPR-2 und NPR-3 in primären

---

humanen Monozyten durch oxLDL reguliert wird. Ebenfalls konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass dieser Effekt in THP-1 und primären humanen Monozyten (PBMCs) unterschiedlich ausgeprägt ist.

Bislang wurde, wie oben geschildert, in vier anderweitigen Studien die Auswirkung von LPS auf die Expression und Sekretion von CNP untersucht. Aufgrund methodischer Sachverhalte sind die Resultate dieser Studien mit den Ergebnissen der vorliegende Arbeit nicht direkt vergleichbar. Nichts desto weniger wurde der Einfluss von LPS auf die CNP Rezeptoren NPR-2 sowie NPR-3 bislang nur in der vorliegenden Arbeit analysiert.

### **4.3. Die Expression inflammatorischer Zytokine unter dem Einfluss von LPS**

Eine Stimulation primärer humaner Monozyten mit LPS führt zu einer gesteigerten Expression und Sekretion inflammatorischer Proteine, wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6. Des Weiteren kommt es durch die Stimulation mit LPS zu einer Hochregulation und verstärkten Expression des LPS Rezeptors CD14 und des Makrophagen Markers CD68. Diese Beobachtungen stimmen mit Forschungsergebnissen anderer Arbeiten überein [70].

Im Gegensatz dazu führt eine Stimulation von THP-1 Zellen mit LPS nur zu einer Hochregulation von Interleukin 6. Ein Grund hierfür ist möglicherweise darin zu sehen, dass es bei THP-1 Zellen zu einem frühzeitigeren Anstieg der inflammatorischen Reaktion kommt und dadurch auch zu einem frühzeitigen Zelluntergang. Demzufolge könnten die unterschiedlichen Ergebnisse von THP-1 Zellen und PBMCs auch durch einen unterschiedlichen zeitlichen Verlauf, in der inflammatorischen Antwort zustande kommen.

In Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit, wurde auch in mehreren anderen Studien eine LPS induzierte Hochregulation sowie Expression von inflammatorischen Proteinen, wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  sowie IL-6 in primären humanen Monozyten beschrieben [2, 19, 29, 107, 157]. Die Methoden, die in den aufgeführten Untersuchungen zur Isolierung der Monozyten angewendet

---

wurden, sowie die zellkulturellen Verfahren, als auch die LPS Konzentrationen (0,01-1 µg/ml) und die Zeitpunkte zu denen Messungen durchgeführt wurden (6-48 Stunden), sind weitestgehend mit den jeweiligen Verfahren und Methoden der vorliegenden Arbeit vergleichbar.

Der Einfluss von LPS auf THP-1 Zellen wurde unter anderem von Perez-Perez et al. analysiert [126]. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, die mit LPS Konzentrationen von 0,05 µg/ml durchgeführt wurde, konnte ein Anstieg von TNF- $\alpha$  auch in der Arbeit von Perez-Perez et al. erst ab einer LPS Konzentration von über 50 µg/ml registriert werden. Alle Versuche, die mit einer geringeren LPS Konzentration durchgeführt wurden, konnten keinen signifikanten Anstieg von TNF- $\alpha$  hervorrufen.

Diese Tatsache wird unter anderem dadurch erklärt, dass die LPS Signaltransduktion durch das LPS Bindungsprotein (LBP) verstärkt wird. Primäre humane Monozyten werden in einem Medium kultiviert, das 10 % autologes Spenderserum enthält und dadurch auch eine unbestimmte Menge an LBP.

Das Medium in dem THP-1 Zellen standardmäßig kultiviert werden enthält dagegen 10 % FCS (Fetal Calf Serum), welches weitestgehend frei von LBP ist. Die Expression von Interleukin 6 (IL-6) dagegen, wurde auch bei THP-1 Zellen durch die Stimulation mit LPS signifikant gesteigert.

Eine weitere Ursache für den unterschiedlichen Einfluss von LPS auf die Reaktion von Monozyten und THP-1 Zellen könnte ein mehr als 4000-fach höherer Expressionsgrad des LPS Rezeptors CD14, in primären humanen Monozyten sein. In der Studie von Bas et al. konnte, im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit, gezeigt werden, dass eine Stimulation der THP-1 Zellen mit LPS zu einem signifikanten Anstieg der TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 Spiegel führt [19].

Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit, waren die LPS Konzentrationen in der Studie von Bas et al. jedoch annähernd 20-fach höher. auch wurde Lipopolysaccharid verwendet, welches aus verschiedenen E-coli Serotypen isoliert wurde, was eine Vergleichbarkeit der Stimulationsergebnisse in Frage

---

stellt. Außerdem wurden die Konzentrationsbestimmungen der oben genannten inflammatorische Marker kumulativ nach 48 Stunden mittels ELISA vorgenommen.

#### **4.4. Die Expression inflammatorischer Zytokine unter dem Einfluss von oxLDL**

In der vorliegenden Arbeit wurden mit Ausnahme von NPR-2 sämtliche Expressionslevel der analysierten Gene, in THP-1 Zellen, durch eine Stimulation mit oxLDL, über 48 Stunden, hochreguliert [siehe Abb. 15]. Im Gegensatz dazu wurden die Expressionslevel von NPR-2 herunter reguliert. Erstaunlicherweise wurden alle analysierten Expressionslevel in primären humanen Monozyten durch eine Stimulation mit oxLDL geringfügig herunter reguliert.

Dieser Effekt war allerdings nur für die Expression von NPR-3 signifikant.

Eine Ursache für diese überraschenden Ergebnisse könnte man in einer unterschiedlichen Expression oder divergierenden Strukturprofilen, von Scavenger Rezeptoren und Toll-like Rezeptoren der primären humane Monozyten sehen. Im Gegensatz zu den strukturell und regelhaft exprimierten Oberflächenrezeptoren der THP-1 Zellen.

Im Jahr 2010 veröffentlichten Levitan et al. einen sehr ausführlichen Übersichtsartikel über die strukturellen Erkennungsmuster sowie die Pathophysiologie des oxidierten LDL [82]. Eine Kernaussage dieser Arbeit ist darin zu sehen, dass die Einflüsse von oxidiertem LDL auf die inflammatorische Antwort von der Konzentration des Lipoproteins abhängig sind.

Hohe Konzentrationen von oxLDL führen zu einer Hemmung von NF- $\kappa$ B und folglich zu einer reduzierten Expression inflammatorischer Mediatoren.

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnten Jovinge et al. zeigen, dass oxLDL in Konzentrationen von  $>15 \mu\text{g/ml}$  die Expression von TNF- $\alpha$  und

---

IL-1 $\beta$  supprimiert, wogegen geringere Konzentrationen von oxLDL die Expression von TNF- $\alpha$  signifikant steigern [67].

In der vorliegenden Arbeit wurde eine oxLDL Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  verwendet. Demzufolge stimmen die oben genannten Ergebnisse der anderweitigen Studien mit unseren Befunden überein, allerdings waren der Abfall von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in primären humanen Monozyten nur als Tendenz zu beobachten und statistisch nicht signifikant.

Die Studie von Jovinge et al. [67] hat einige Ähnlichkeiten mit den Versuchen, die in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden. Die Monozyten, bzw. Makrophagen wurden durch ein vergleichbares methodisches Vorgehen isoliert und die Analyse der Expressionsspiegel erfolgte, wie in der vorliegenden Arbeit, nach 48 Stunden.

Ein Unterschied besteht darin, dass in der Arbeit von Jovinge et al. das LDL durch eine höhere Konzentration von  $\text{CuSO}_4$  oxidiert wurde, der Inkubationsprozess jedoch nur für 18 Stunden und damit etwas kürzer durchgeführt wurde. Darüber hinaus wurde die Expressionsanalyse der inflammatorischen Zytokine mittels ELISA durchgeführt und nicht, wie in der vorliegenden Arbeit, durch quantitative RT-PCR.

Im Gegensatz dazu konnte die Arbeit von Ardans et al. zeigen, dass eine Stimulation peripherer primärer humaner Monozyten mit 5  $\mu\text{g/ml}$  oxidiertem LDL keinen Einfluss auf die Sekretion von Prostaglandin-E2 (PGE2) hat [6]. Allerdings wurden auch diese Messergebnisse durch ELISA gewonnen und zwar bereits nach einer Inkubationszeit von nur 24 Stunden.

In einer Untersuchung von Taketa et al. konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation über 24 Stunden mit oxidiertem LDL, in Konzentrationen von 40  $\mu\text{g/ml}$ , die Aktivität von NF- $\kappa\text{B}$  steigern kann [155].

In Bezug darauf muss allerdings erwähnt werden, dass diese Studie mit peritonealen Makrophagen von der Maus durchgeführt wurde und das hierbei angewandte oxLDL, niedrigere Konzentrationen von TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) enthielt.

---

Darüber hinaus wurde in einer Arbeit von Terkeltaub et al. aus dem Jahre 1994 gezeigt, dass eine Stimulation von PBMCs über 24 Stunden, mit oxLDL in Konzentrationen von 40 µg/ml zu einem Abfall der Sekretion von IL-1β führt [157]. In diesem Versuchsansatz konnten allerdings keine Veränderung der TNF-α Sekretion registriert werden.

Eine Forschungsgruppe um Mikita konnte 2001 nachweisen, dass die Spiegel von IL-1β und TNF-α durch die Stimulation von THP-1 Zellen über 72 Stunden mit oxLDL, in Konzentrationen von 100 µg/ml, geringfügig anstiegen [100]. Diese Befunde stimmen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein. Im Gegensatz zu diesen Resultaten stehen die Ergebnisse einer Studie von Qiu et al. aus dem Jahre 2007 [131].

In dieser Arbeit wurden die Konzentrationen, bzw. die Expression von TNF-α, IL-1β sowie IL-6 durch den Einfluss von oxLDL reduziert. Sowohl die oxLDL Konzentrationen, als auch die Oxidationsgrade des Lipoproteins waren mit denen der vorliegenden Arbeit identisch.

Jedoch muss darauf hingewiesen werden, dass in der Arbeit von Qiu et al. der Zeitpunkt, zu dem die Messungen vorgenommen wurden bei 72 Stunden lag und nicht bei 48 Stunden, wie in der vorliegenden Arbeit. Hinzu kommt, dass die THP-1 Zellen, die in diesen Versuchen verwendet wurden, zuvor mit einem von Lentiviren stammenden Kontrollplasmid transfiziert wurden. In einer weiteren Versuchsreihe von Terkeltaub et al. konnte kein Effekt von oxidiertem LDL, in Konzentrationen von 75 µg/ml, auf die Expression von IL-1β nachgewiesen werden [157].

Die Expressionsbestimmungen wurden hierbei bereits nach 24 Stunden vorgenommen. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Resultate der vorliegenden Arbeit im Wesentlichen mit den Ergebnissen der bislang zu diesem Thema veröffentlichten, methodisch vergleichbaren Studien vereinbar sind.

---

## 4.5. Einfluss von LPS und oxLDL auf die NPR-2/NPR3-Ratio

Durch oxidiertes LDL wird eine intrazelluläre Signalkaskade, über eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) ausgelöst [133]. Hierbei vermitteln die Rezeptoren NPR-2 und NPR-3 gegenläufige Reaktionen [3]. Während NPR-2 zu einer Aktivitätsabnahme der PKC führt, aktiviert NPR-3 die Proteinkinase C, über eine Stimulation der Phospholipase C [3].

Aufgrund dieser zellphysiologischen Beobachtung kann man darauf schließen, dass je größer das Verhältnis der NPR-2/NPR-3 Expressionsspiegel ist, desto stärker sollte die Hemmung von CNP auf, die durch oxLDL induzierten Effekte ausfallen.

Die NPR2/3-Ratio variiert in PBMCs über die Zeit sowie nach Stimulation mit LPS und oxLDL (Abb. 16). In der vorliegenden Arbeit war das NPR-2/NPR-3 Verhältnis in THP-1 Zellen zum Zeitpunkt 0, sowie nach 48 Stunden größer als in den humanen Monozyten (siehe Abb. 16). Zu dem Messzeitpunkt von 24 Stunden sinkt das NPR-2/NPR-3 Verhältnis in beiden Zeitlinien, auf das etwa gleiche Niveau ab. Die Stimulation mit LPS über 24 Stunden führte zu einem größeren NPR-2/NPR-3 Verhältnis auf Seiten der humanen Monozyten.

Die Behandlung mit oxidiertem LDL über 48 Stunden führte bei den humanen Monozyten zu einem signifikanten Anstieg des NPR-2/NPR-3 Verhältnisses. Dagegen zu einem signifikanten Abfall der NPR-2/NPR-3 Ratio bei den THP-1 Zellen. Demzufolge scheint oxidiertes LDL über den Phospholipase-C/Proteinkinase-C Signalweg einen negativen Rückkoppelungsmechanismus in humanen Monozyten auszulösen. Oxidiertes LDL ist ebenfalls in Lage eine intrazelluläre Signaltransduktion über den MAP-Kinase-Signalweg auszulösen [3]. Über diesen Signalweg kann einem durch oxLDL induzierten Abfall der NPR-3 Expression in humanen Monozyten entgegengewirkt werden.

Dem gegenüber steht jedoch der Befund, dass eine Behandlung von THP-1 Zellen über 48 Stunden mit oxLDL zu einem Abfall der NPR-2/NPR-3 Ratio führt. Diese Erkenntnis könnte auf einen positiven Rückkoppelungs-Mechanismus schließen lassen.



---

Abschließend muss man festhalten, dass der resultierende Effekt des NPR-2/NPR-3 Verhältnisses auf die, durch oxLDL ausgelösten, intrazellulären Signalkaskaden noch weiter aufgeklärt werden sollte. Es ist zudem festzuhalten, dass die durch oxLDL ausgelösten Effekte durch verschiedenste intrazelluläre Signalwege zustande kommen, welche zum Teil durch NPR-2/NPR3 beeinflusst werden und zum Teil durch andere synergistische oder sogar antagonistische Signalkaskaden.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass das NPR-2/NPR-3 Verhältnis für den Einfluss von CNP auf Effekte, welche durch oxidiertes LDL verursacht werden, von großer Bedeutung ist. Jedoch werden weiterführende Studien benötigt um die verschiedenen intrazellulären Signalwege detailliert aufschlüsseln zu können. Dies gilt besonders für Signalkaskaden, die bei Stimulationsversuchen mit oxLDL eine Rolle spielen und welche interessanterweise bei THP-1 Zellen und humanen Monozyten zu komplett unterschiedlichen Expressionsmustern geführt haben.

#### **4.6. Einfluss von CNP auf das Expressionsmuster (durch M-CSF) ausdifferenzierter Makrophagen.**

Monozyten, aber v.a. Makrophagen waren die ersten inflammatorischen Zellen, die mit der Entstehung und Pathogenese der Arteriosklerose in Verbindung gebracht wurden [47]. Makrophagen sind mononukleäre Zellen, die der Phagozytose sowohl von exogenen Mikroorganismen (u.a. Bakterien und Parasiten) als auch endogenen Molekülen sowie u.a. virusinfizierten apoptotischen Zellen dienen und denen durch diese Fähigkeiten eine zentrale Rolle zukommt in der Immunabwehr [132].

Makrophagen exprimieren eine große Anzahl von verschiedenen Scavenger Rezeptoren so beispielsweise MSR1, SR-BI, CD36, CD68, LOX-1 oder SREC, die als sog. pattern recognition receptors diverse charakteristische Oberflächenstrukturen von pathogenen Erregern, Fremdkörpern oder kranken/infizierten Zellen erkennen und dadurch eine bedeutsame Rolle in der angeborenen Immunreaktion spielen [132].

---

Der Makrophagen Scavenger Rezeptor 1 (MSR1) und CD36 vermitteln die Aufnahme von oxLDL durch Makrophagen und führen, wie oben bereits ausführlich beschrieben, über eine Akkumulation von Cholesterolestern (CE) schließlich zur Schaumzellbildung [132]. Eine weitere Rezeptorklasse, die ein zentrales Bindeglied in der Verbindung zwischen Lipidmetabolismus, angeborenem Immunsystem und Arterioskleroseentstehung darstellt, sind die toll-like Rezeptoren (TLR) und hier v.a. die Subtypen TLR-1, TLR-2 und TLR-4 [132].

In einigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass modifizierte und oxidierte Formen von LDL TLR-4/CD14-vermittelt direkten Einfluss auf die Funktion von Makrophagen haben und dies unabhängig von der Akkumulation von Cholesterolestern und der Schaumzellbildung geschah [101, 102].

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb untersucht, ob CNP nicht nur durch direkte Hemmung der Inflammation [70], sondern auch durch eine Modulation der Expressionsstärken der oben genannten Rezeptoren einen Einfluss auf die Entstehung der Atherosklerose haben könnte. Alle Untersuchungen und Experimente basierten erneut auf dem oben beschriebenen Zellkulturmodell humaner PBMC.

Als Kontrollgruppe dienten Monozyten, die in einem Standardmedium unter Zusatz von M-CSF zur Induktion der Ausdifferenzierung kultiviert wurden. In der zweiten Gruppe wurde dem Medium zusätzlich CNP zugegeben. Als zweite Kontrolle wurden Monozyten nur unter Zusatz von CNP kultiviert. Die Expressionsraten von CD14, CD36, CD68, TLR-4, MSR-1, CNP, NPR2 und NPR3 sind in den Abbildungen 18-25 dargestellt.

CNP führte zu einer signifikanten Dämpfung der Überexpression der untersuchten Scavenger Rezeptoren CD36 und CD68, während eine Überexpression von TLR-4 und MSR-1 nicht gänzlich verhindert, jedoch um etwa vier Tage verzögert werden konnte. CNP hemmt seine eigene Überexpression und die seiner Rezeptoren.

Aufgrund der bisher vorliegenden Daten kann man folgern, dass CNP somit neben der direkten Hemmung der inflammatorischen Reaktion auch durch eine

---

Modulation der Rezeptoren einen Einfluss auf das Fortschreiten der Arteriosklerose haben könnte. In diesem Zusammenhang ist es von großer Bedeutung weitere Untersuchungen durchzuführen, die zur Aufschlüsselung des, durch oxLDL ausgelösten, intrazellulären Signalweges beitragen.

#### **4.7. CNP hat einen hemmenden Einfluss auf die LPS induzierte inflammatorische Reaktion humaner Monozyten**

Wie in der Einleitung bereits ausführlich beschrieben, hat das natriuretische Peptid Typ-C im menschlichen Organismus mannigfaltige Einflüsse, über deren physiologische Bedeutung man sich teilweise jedoch noch nicht vollständig im Klaren ist. Die vorliegende Arbeit untersucht hierbei zum ersten Mal den Einfluss von CNP auf die LPS induzierte Produktion inflammatorischer Zytokine in primären humanen Monozyten/Makrophagen.

Wie oben bereits beschrieben kam es durch die Stimulation mit LPS in humanen Monozyten zu einer statistisch signifikant gesteigerten Expression inflammatorischer Moleküle, wie IL-1 $\beta$ , IL-6 sowie CD68. Auch in Bezug auf CNP konnte eine signifikant erhöhte Expression nachgewiesen werden (siehe Abbildung 14). Diese Befunde stimmen mit den Ergebnissen aus methodisch vergleichbaren Studien überein [2, 19, 125, 157].

Durch die Zugabe von CNP kam es zu einer signifikanten Unterdrückung der LPS induzierten Überexpression von NPR-2, NPR-3, TNF- $\alpha$ , IL-6, CD14 und CD68 (siehe Abbildung 20). Eine beobachtete Unterdrückung der Überexpression von CNP und IL-1 $\beta$  war statistisch nicht signifikant. Auf Monozyten, die mit oxidiertem LDL stimuliert wurden konnte kein Einfluss von CNP nachgewiesen werden. Bei diesen Versuchen kam es zu keinen Veränderungen der Genexpression, gegenüber den Experimenten in denen oxLDL als einziger Stimulus verwendet wurde. Lediglich die Stimulation mit hohen Konzentrationen von 10  $\mu$ g/ml CNP führte zu einer signifikant erhöhten Genexpression von TNF- $\alpha$ .

---

In einer Studie von Kiemer et al. aus dem Jahre 2000 konnte bereits gezeigt werden, dass die Natriuretischen Peptide einen hemmenden Einfluss auf die LPS induzierte Expression von Zytokinen haben können. In dieser Arbeit wurde die TNF- $\alpha$  Sekretion in LPS stimulierten Maus Makrophagen durch ANP signifikant gehemmt. Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit konnte in dieser Studie jedoch kein statistisch signifikanter hemmender Effekt von CNP auf die TNF- $\alpha$  Sekretion nachgewiesen werden [70]. Allerdings konnte gezeigt werden, dass CNP sowie der Rezeptor Ligand cANF<sup>4-23</sup> die proinflammatorische Produktion von Prostaglandin-E2 durch die Cyclooxygenase-2 unterdrücken kann. Jedoch muss man darauf hinweisen, dass in dieser Versuchsreihe mit aus dem Knochenmark isolierten Mausmakrophagen gearbeitet wurde, auch war die LPS Konzentrationen von 1 $\mu$ g/ml höher als in der vorliegenden Arbeit und die Inkubationszeit der Zellen betrug lediglich vier Stunden.

In einer weiteren Arbeit von Mitkiewicz M et al. wurden PBMCs von der Ratte, mit LPS stimuliert. In diesen Experimenten konnte eine Hemmung von ANP und CNP auf die Produktion inflammatorischer Moleküle, wie TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  sowie IL-6 registriert werden [104]. Eine Unterdrückung der IL-1 $\beta$  Sekretion musste in der vorliegenden Arbeit als nicht statistisch signifikant angenommen werden, aber ansonsten konnten auch in der vorliegenden Arbeit vergleichbare Resultate festgestellt werden. In der Untersuchung von Mitkiewicz et al. wurde mit LPS Konzentrationen von 1  $\mu$ g/ml gearbeitet. Auch wurden die Zellen nur für 30 Minuten mit LPS inkubiert. Die abschließenden Analysen wurden, wie in der vorliegenden Arbeit mittels RT-PCR gewonnen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Daten der vorliegenden Arbeit mit den Ergebnissen früherer Studien (soweit methodisch vergleichbar) konsistent sind. Diese, sowie ein Großteil der publizierten Studien zeigten einen hemmenden Effekt des natriuretischen Peptides Typ-C auf die LPS induzierte Produktion inflammatorischer Zytokine. Der hemmende Einfluss von CNP auf die LPS induzierte Überexpression seiner Rezeptoren NPR-2 und NPR-3 wurde bislang (soweit uns bekannt) nur in der vorliegenden Arbeit untersucht, ebenso der Effekt von CNP auf CD14 und CD68. Die Herunterregulierung der eigenen Rezeptoren ist in diesem Zusammenhang vermutlich als Ausdruck eines negativen Feedback Mechanismus zu sehen.

---

Aus einer ganzen Reihe von Studien und Übersichtsarbeiten geht hervor, dass CNP einen substantiellen Einfluss auf inflammatorische Prozesse, u.a. im Gefäßsystem hat wodurch ihm eine bedeutende Rolle in der Arteriosklerose Entstehung zukommen könnte. Über welche intrazellulären Mechanismen diese hemmenden Effekte zustande kommen, ist jedoch bisher nur zum Teil geklärt [54, 61].

## **4.8. Grenzen der Studie**

Man muss sich darüber im Klaren sein, dass PBMCs eine inhomogene Zellfraktion darstellen. Limitierung in der Aussagekraft der Ergebnisse ergeben sich nicht nur aus dieser Inhomogenität sondern auch aus der Variabilität der Blutspender, der Zellvitalität und dem Einfluss anderer Blutzellen sowie Blutbestandteile, auf das Reaktionsverhalten der isolierten mononukleären Zellen [130].

Spricht man von PBMCs, so sind damit nicht nur Monozyten gemeint, diese Zellfraktion beinhaltet darüber hinaus u.a. noch Lymphozyten sowie natürliche Killerzellen. Es ist nicht auszuschließen, dass alle o.g. Faktoren einen gewissen Einfluss auf die Validität und Varianz der experimentell gewonnenen Resultate haben.

In der vorliegenden Arbeit wurden die PBMCs durch Zentrifugation in einem Dichtegradienten isoliert und durch anschließendes Absetzen in einer Zellkulturflasche von anderen Zellen, v.a. Lymphozyten, gereinigt. Dieses methodische Vorgehen zur Isolierung bzw. Reinigung der primären humanen Monozyten könnte ebenfalls einen Einfluss auf die Basisexpression der Gene haben.

Da aber alle Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ausgehend von dieser Methode gewonnen wurden ist davon auszugehen, dass die Resultate aus allen Versuchen untereinander direkt vergleichbar sind. Dasselbe gilt auch für die Effekte, die unter der Stimulation mit LPS, oxLDL, M-CSF sowie CNP beobachtet werden konnten.

---

Um möglichen Interferenzen der Isolierungsmethode mit den Resultaten entgegenzuwirken, könnte man Monozyten für zukünftige Experimente durch negative Selektion gewinnen. Durch diese Methode der negativen Selektion, werden alle Zellen, die nicht den Oberflächenmarker CD14 tragen aus dem Zellgemisch entfernt und zurück bleiben sogenannte „untouched“ CD14<sup>+</sup> Monozyten. Leider war zu der Zeit, als die Experimente der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, diese Methode in unserem Labor nicht verfügbar.

## 4.9. Kernaussagen

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Basisexpression von CNP-NPR-2, NPR-3, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, CD14 und CD68 in THP-1 Zellen signifikant niedriger ausgeprägt war, im Vergleich zu primären humanen Monozyten. In beiden Zelllinien führt eine Stimulation mit oxidiertem LDL zu einem divergierenden Wechsel in der Expression der oben genannten Gene. Des Weiteren konnte durch oxLDL ein gegensätzlicher Effekt auf das NPR-2/NPR-3 Verhältnis von THP-1 Zellen und primären humanen Monozyten beobachtet werden.

Im Hinblick auf Experimente, die sich mit dem Natriuretische Peptid Typ-C (CNP) und seinen Rezeptoren NPR-2 und NPR-3 beschäftigen, sollten Daten die in Versuchen mit THP-1 Zellen gewonnen wurden, zukünftig durch Versuche mit primären humanen Monozyten validiert werden. Auch wenn deren Handhabung deutlich schwieriger und aufwändiger ist.

Dennoch können THP-1 Zellen weiterhin als Negative Kontrolle dienen, so beispielsweise für zukünftige Studien, die sich mit den intrazellulären Signalkaskaden von Monozyten und Makrophagen beschäftigen. Dies gilt im Besonderen für Effekte des oxidierten LDLs auf das CNP-System in Monozyten und Makrophagen.

---

## 5. Zusammenfassung

Monozyten und Makrophagen spielen eine wichtige Rolle während der Entstehung atherosklerotischer Plaques und Läsionen. Als ein grundlegender Pathomechanismus wird die Aufnahme von subendothelial oxidierten Lipoproteinen, v.a. oxLDL, durch Monozyten und Makrophagen diskutiert. Im Gegensatz zur regulierten und Feedback gehemmten Aufnahme von nativen LDL, erfolgt die Aufnahme von oxLDL im Wesentlichen ungehemmt über sog. Scavenger-Rezeptoren. Die Makrophagen wandeln sich im Folgenden zu Schaumzellen um und sezernieren inflammatorische Zytokine, die wiederum den Prozess der Plaqueentstehung und einen inflammatorische Teufelskreis aufrecht erhalten.

Das natriuretische Peptid Typ-C zeigt eine starke Expression in atherosklerotischen Plaques der Koronargefäße sowie der Carotiden, wobei diese verstärkte Expression v.a. in den dort ortsständigen Makrophagen nachzuweisen ist. Somit ist es von Interesse, welchen Einfluss CNP auf Monozyten bzw. Makrophagen und damit auf die Pathogenese der Atheroskleroseentstehung besitzt.

In der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss von Natriuretischem Peptid Typ-C auf das physiologische und pathophysiologische Expressionsmuster von humanen Monozyten, sowie THP-1 Zellen untersucht werden. In wieweit die aus THP-1 Zellen gewonnenen Erkenntnisse auf primäre humane Monozyten übertragbar sind ist ungewiss. Deshalb wurde in dieser Studie zum einen die Basisexpression von CNP, NPR2, NPR3, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, CD14 und CD68 in THP-1 Zellen gemessen und mit der von humanen, gesunden Monozyten bzw. monozytärer Zellen (peripheral blood monocyctic cells, PBMC) verglichen. Zudem wurden beide Zellarten sowohl mit LPS als auch mit oxLDL stimuliert und die Änderungen der Expressionsstärken der oben genannten Gene analysiert.

Hierzu wurden etablierte Zellkulturmodelle verwendet. Aus dem peripheren, venösen Blut gesunder Probanden wurden die mononukleären Zellen per

---

Zentrifugieren über einen Dichtegradienten isoliert und die Monozyten durch das Entfernen nichthaftender Zellen selektioniert.

In PBMC waren alle oben genannten Gene statistisch signifikant stärker exprimiert. LPS führte in PBMC zu einer Steigerung der Expressionsraten aller Gene. Diese Änderungen waren für CNP, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, CD14 und CD68 statistisch signifikant. Dagegen führte LPS in THP-1 Zellen nur bei IL-6 zu einer signifikanten Steigerung der Expressionsrate. Die Stimulierung der Zellen mit oxLDL führte in PBMC zu divergierenden Effekten als in THP-1 Zellen. Während es in PBMC tendenziell zu einem Abfall der Expressionsraten kam (nur für NPR3 signifikant), führte oxLDL in THP-1 Zellen zu einem signifikanten Anstieg von NPR3, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, CD14 und CD68, sowie zu einem signifikanten Abfall der Expressionsraten von NPR2.

Zusammenfassend konnte dieser Versuchsansatz der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sowohl das Basisgenexpressionsprofil von PBMC und THP-1 Zellen deutliche Unterschiede aufweist und dass beide Zellarten unterschiedlich auf Stimulation mit LPS und oxLDL reagieren. Aufgrund dieser deutlichen Unterschiede sollten für die Erforschung der pathophysiologischen Rolle der Monozyten bei der Arterioskleroseentstehung trotz der mühsameren und aufwendigeren Handhabung vorzugsweise humane, gesunde, periphere Monozyten verwendet werden, um Ergebnisse, die aus THP-1 Zellen gewonnen wurden zu validieren.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde untersucht, ob CNP nicht nur durch eine potentiell direkte Hemmung der Inflammation, sondern auch durch Modulation der Expressionsstärken der natriuretischen Peptid Rezeptoren einen Einfluss auf die Entstehung der Arteriosklerose haben könnte. Alle Untersuchungen basieren erneut auf dem oben beschriebenen etablierten Zellkulturmodell humaner PBMC. Als Kontrollgruppe dienten Monozyten, die in einem Standardmedium unter Zusatz von M-CSF zur Induktion der Ausdifferenzierung kultiviert wurden. In der zweiten Gruppe wurde dem Medium zusätzlich CNP zugegeben.

Als zweite Kontrolle wurden Monozyten nur unter Zusatz von CNP kultiviert. Die Expressionsraten von CD14, CD36, CD68, TLR-4, MSR-1, CNP, NPR2 und



---

NPR3 wurden in diesem Versuchsansatz bestimmt. CNP führte zu einer signifikanten Dämpfung der Überexpression der untersuchten Scavenger Rezeptoren CD36 und CD68, während eine Überexpression von TLR-4 und MSR-1 nicht verhindert, jedoch um ca. 4 Tage verzögert wurde. CNP hemmt seine eigene Überexpression und die seiner Rezeptoren. Aufgrund der bisher vorliegenden Daten kann man folgern, dass CNP somit neben der direkten Hemmung der inflammatorischen Reaktion auch durch Rezeptorenmodulation einen Einfluss auf die Arterioskleroseprogression haben könnte.

---

## 6. Literatur

1. Adams DO. Molecular interactions in macrophage activation. *Immunol Today* 1989; 10:33-35.
2. Ahmadzadeh E, Zarkesh-Esfahani H, Roghanian R, Akbar FN. Comparison of *Helicobacter pylori* and *Escherichia coli* in induction of TNF-alpha mRNA from human peripheral blood mononuclear cells. *Indian J Med Microbiol* 2010; 28:233-237.
3. Anand-Srivastava MB. Natriuretic peptide receptor-C signaling and regulation. *Peptide*. 2005 Jun; 26(6):1044-59.
4. Anitschkow N. [On the morphodynamics of coronary sclerosis of the heart.]. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1960; 49:426-32.
5. Ardans JA, Economou AP, Martinson JM Jr., Zhou M, Wahl LM. Oxidized low-density and high-density lipoproteins regulate the production of matrix metalloproteinase-1 and -9 by activated monocytes. *J Leukoc Biol* 2002; 71:1012-1018.
6. Ardans JA, Zhou M, Wahl LM. Interferon-gamma differentially regulates monocyte matrix metalloproteinase-1 and -9 through tumor necrosis factor alpha and caspase 8. *J. Biol. Chem* Nov. 2003; 278(46):45406-13
7. Aschoff, L. Das reticulo-endotheliale System. *Ergebn. in med. Kinderheilkunde* 1924; 26:1-118.
8. Auffray C, Fogg DK, Narni-Mancinelli E, Senechal B, Trouillet C, Saederup N, Leemput J, Bigot K, Campisi L, Abitbol M, Molina T, Charo I, Hume DA, Cumano A, Lauvau G, Geissmann F. CX3CR1+ CD115+ CD135+ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. *J Exp Med*. 2009 Mar 16;206(3):595-606.
9. Auffray, Cedric, Sieweke, Michael H und Geissman, Frederic. Blood Monocytes: Development, Heterogeneity and Relationship with Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol*. 2009; 27:669-692.
10. Auwerx J. The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia* 1991; 47(1): 22-31.
11. Avwioro G. Histochemical uses of haematoxylin – a review. *JPCS* 2011; 1:24-34.
12. Babaev VR, Bobryshev YV, Sukhova GK, Ksantseva IA. Monocyte/macrophage accumulation and smooth muscle cell phenotypes in early atherosclerotic lesions of human aorta. *Atherosclerosis* 1993; 100(2):237-248.

- 
13. Babaev VR, Yancey PG, Ryzhov SV, Kon V, Breyer MD, Magnuson MA, Fazio S, Linton MF. Conditional knockout of macrophage PPAR gamma increases atherosclerosis in C57BL/6 and low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2005; 25(8):1647-1653.
  14. Babior BM, The respiratory burst oxidase. *Trends in Biochemical Science* 1987; 12:241-243.
  15. Bagby GC Jr., Dinarello CA, Wallace P, Wagner C, Hefeneider S und McCall E. Interleukin-1 stimulates granulocyte macrophage colony-stimulating activity release by vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1986; 78:1316-1323.
  16. Banks M, Wei CM, Kim CH, Burnett JC Jr., Miller VM. Mechanism of relaxations to C-type Natriuretic peptide in veins. *Am J Physiol* 1996; 271(5 Pt. 2):H1907-H1911.
  17. Barletta G, Lazzeri C, Vecchiarino S, Del Bene R, Messeri G, Dello SA, Manelli M, La Villa G. Low-dose C-type Natriuretic peptide does not affect cardiac and renal function in humans. *Hypertension* 1998; 31(3):802-808.
  18. Barton M, Beny JL, d'Uscio LV, Wyss T, Noll G, Luscher TF. Endothelium-independent relaxation and hyperpolarization to C-type natriuretic peptide in porcine coronary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 31(3):377-383.
  19. Bas S, Neff L, Vuillet M, Spenato U, Seya T, Matsumoto M, Gabay C. The proinflammatory cytokine response to *Chlamydia trachomatis* elementary bodies in human macrophages is partly mediated by a lipoprotein, the macrophage infectivity potentiator, through TLR2/TLR1/TLR6 and CD14. *J Immunol* 2008; 180:1158-1168.
  20. Bobryshev YV. Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis. *Micron* 2006; 37:208-222.
  21. Böcker W, Denk H, Heitz PU. *Pathologie*. 3. Auflage, Urban & Fischer 2004.
  22. Böyum A. A one-stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood. General sedimentation properties of white blood cells in a 1g gravity field. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1968; 97:51-76.
  23. Brelje TC, Wessendorf MW, Sorenson RL. Multicolor laser scanning confocal immunofluorescence microscopy: practical application and limitations. *Methods Cell Biol* 2002; 70:165-244.
  24. Brenner BM, Ballermann BJ, Gunning ME, Zeidel ML. Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide. *Physiol Rev* 1990; 70(3):665-699.
  25. Broudy VC, Kaushansky K., Segal GM, Harlan JM und Adamson JW. Tumor necrosis factor type alpha stimulates human endothelial cells to produce granulocyte /macrophage colony stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:7467-7471.

- 
26. Buschmann IR, Hoefler IE, van Royen N, Katzer E, Braun-Dulleus R, Heil M, Kostin S, Bode C, Schaper W. GM-CSF: a strong arteriogenic factor acting by amplification of monocyte function. *Atherosclerosis*. 2001; 159:343-356.
  27. Caligiuri G, Rudling M, Ollivier V, Jacob MP, Michel JB, Hanson GK, Nicoletti A. Interleukin-10 deficiency increases atherosclerosis, thrombosis, and low-density lipoproteins in apolipoprotein E knockout mice. *Mol Med* 2003; 9:10-17.
  28. Cannistra SA, Rambaldi A, Spriggs DR, Herrmann F, Kufe D und Griffin JD. Human granulocyte-macrophage colony stimulating factor induces expression of the tumor necrosis factor gene by U937 cell line and by normal peripheral blood monocytes. *J Clin Invest* 1987; 79:1720-1728.
  29. Caruso R, Stolfi C, Sarra M, Rizzo A, Fantini MC, Pallone F, MacDonald TT, Monteleone G. Inhibition of monocyte-derived inflammatory cytokines by IL-25 occurs via p38 Map kinase-dependent induction of Socs-3. *Blood* 2009; 113:3512-3518.
  30. Casco VH, Veinot JP, Kuroski de Bold ML, Masters RG, Stevenson MM, de Bold AJ. Natriuretic peptide system gene expression in human coronary arteries. *J Histochem Cytochem*. 2002 Jun; 50(6):799-809.
  31. Chang MS, Lowe DG, Lewis M, Hellmiss R, Chen E, Goeddel DV: Differential activation by atrial and brain natriuretic peptides of two different receptor guanylate cyclases. *Nature* 1989; 341:68–72.
  32. Chauhan SD, Nilsson H, Ahluwalia A, Hobbs AJ. Release of C-type natriuretic peptide accounts for the biological activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(3):1426-1431.
  33. Chisolm GM, Chai Y. Regulation of cell growth by oxidized LDL. *Free Radic Biol Med* 2000; 28:1697-1707.
  34. Chitu V, Stanley ER. Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation. *Curr Opin Immunol* 2006; 18(1): 39-48.
  35. Classen M, Diehl V, Kochsiek K. *Innere Medizin*. 5. Auflage, Urban & Fischer 2003.
  36. Coons AH, Creech HJ, Jones RN. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol Med* 1941; 47:200-202.
  37. Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MK, Dockrell DH. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS ONE* 2010; 5(1):e8668.
  38. De Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci* 1981; 28:89-94.

- 
39. De Carvalho CM, Bonnefont-Rebeix C, Picandet S, Bernaud J, Phothirath P, Chabanne L, Marchal T, Magnol JP, Rigal D. Evaluation of elutriation and magnetic microbead purification of canine monocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 2004; 101:171-178.
  40. Eckstein HH, Heider P, Wolf O. Chirurgische Therapie extrakranieller Karotisstenosen – Schlaganfallprophylaxe auf höchstem Evidenzniveau. *Deutsches Ärzteblatt* 2004; 101(41):A2753-A2762.
  41. Ferreri M, Millet I, Paliwal V, Herzog W, Solomon D, Ramabhadran R und Askenase PW. TNF alpha is an effective therapeutic target for rheumatoid arthritis. *Ann N.Y. Acad Sci* 1991; 766:272-278.
  42. Fingerle-Rowson G, Auers J, Kreuzer E, Fraunberger P, Blumenstein M, Ziegler-Heitbrock LH. Expansion of CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes in critically ill cardiac surgery patients. *Inflammation* 1998; 22:367-379.
  43. Furth R van, Cohn ZA, Hirsch JG, Humphry JH, Spector WG, und Langevoort HL. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes and their precursor cells 1972. *Bull WHO*; 46:845-852.
  44. Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory Mechanisms of Atherosclerosis. *Annu Rev Immunol* 2009; 27:165-197.
  45. Gauldie J, Richards C, Harnish D, Lansdorff P und Baumann F. Interferon B2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase response in liver cells *Proc. Natl Acad Sci USA* 1987; 84:7251-7255.
  46. Geissmann, Frederic, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *Science*. Februar 2010; 327:656-661.
  47. Gerrity RG, Naito HK, Richardson M, Schwartz CJ. Dietary induced atherogenesis in swine. Morphology of the intima in prelesion stages. *Am J Pathol* 1979; 95:775-79.
  48. Gleissner CA, Leitinger N und Ley K. Effects of native and modified low-density lipoproteins on monocyte recruitment in atherosclerosis. *Hypertension* 2007; 50:276-283.
  49. Goldbourt U, Neufeld HN. Genetic aspects of arteriosclerosis. *Arteriosclerosis* 1986; 6:357-377.
  50. Grage-Griebenow, E, Flad, H-D und Ernst, M. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *Journal of Leukocyte Biology*. Januar 2001; 69:11-20.
  51. Graziani-Bowering GM, Graham JM, Filion LG. A quick, easy and inexpensive

- 
- method for the isolation of human peripheral blood monocytes. *J Immunol Methods* 1997; 207:157-168.
52. Grundy SM. Metabolic syndrome: connecting and reconciling cardiovascular and diabetes worlds. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47:1093-1100.
  53. Hallenbeck JM, Hansson GK, Becker KJ. Immunology of ischemic vascular disease: plaque to attack. *Trends Immunol.* 2005; 26(10): 550-6.
  54. Hama N, Itoh H, Shirakami G, Suga S, Komatsu Y, Yoshimasa T, Tanaka I, Mori K, Nakao K. Detection of C-type Natriuretic peptide in human circulation and marked increase of plasma CNP level in septic shock patients. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 198(3):1177-1182.
  55. Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, Yan ZQ. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circulation Research* 2002; 91(4):281-291.
  56. Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2006;6:508-519.
  57. Hansson GK. Atherosclerosis--an immune disease: The Anitschkov Lecture 2007. *Atherosclerosis.* 2009 Jan;202(1):2-10.
  58. Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2001; 21(12):1876-1890.
  59. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352:1685-1695.
  60. Heath WR, Belz GT, Behrens GM, Smith CM, Forehan SP, Parish IA, Davey GM, Wilson NS, Carbone FR, Villadangos JA. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev.* Jun 2004;199:9-26.
  61. Hobbs AJ, Foster P, Prescott C, Scotland RS, Ahluwalia A. Natriuretic peptide receptor-C regulates coronary blood flow and prevents myocardial ischemia/reperfusion injury: a novel cardioprotective role for endothelium-derived C-type Natriuretic peptide. *Circulation* 2004; 110:1231-1235.
  62. Honing ML, Smits P, Mirrison PJ, Burnett Jr. JC, Rabelink TJ. C-type Natriuretic peptide-induced vasodilation is dependent on hyperpolarization in human forearm resistance vessels. *Hypertension* 2001; 37(4):1179-1183.
  63. Horelt A, Belge KU, Steppich B, Prinz J, Ziegler-Heitbrock LH. The CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes in erysipelas are expanded and show reduced cytokine production. *Eur J Immunol* 2002; 32:1319-1327.
  64. Hu H, Pierce GN, Zhong G. The atherogenic effects of Chlamydia are dependent on serum cholesterol and specific to Chlamydia pneumoniae. *J Clin Invest* 1999; 103:747-753.

- 
65. Igaki T, Itoh H, Suga S, Hama N, Ogawa Y, Komatsu Y, Mukoyama M, Sugawara A, Yoshimasa T, Tanaka I, Nakao K. C-Type Natriuretic peptide in chronic renal failure and its action in humans. *Kidney Int Suppl* 1996; 55:S144-S147.
  66. Inoue K, Naruse K, Yamagami S, Mitani H, Suzuki N, Takei Y. Four functionally distinct C-type natriuretic peptides found in fish reveal evolutionary history of the natriuretic peptide system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Aug 19; 100(17):10079-84.
  67. Jovinge S, Ares MP, Kallin B, Nilsson J. Human monocytes/macrophages release TNF-alpha in response to Ox-LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 1573-1579.
  68. Kalk P, Sharkovska Y, Kashina E, von Websky K, Relle K, Pfab T, Alter M, Guillaume P, Provost D, Hoffmann K, Fischer Y, Hocher B. Enothelin-converting enzyme/neutral endopeptidase inhibitor SLV338 prevents hypertensive cardiac remodeling in a blood pressure-independent manner. *Hypertension* 2001; 57(4):755-763.
  69. Kalra PR, Clague JR, Bolger AP, Anker SD, Poole-Wilson PA, Struthers AD, Coats AJ. Myocardial production of C-type Natriuretic peptide in chronic heart failure. *Circulation* 2003; 107(4):571-573.
  70. Kierner AK, Lehner MD, Hartung T, Vollmar AM. Inhibition of cyclooxygenase-2 by natriuretic peptides. *Endocrinology* 2002; 143(3): 846-852.
  71. Kistler, J. P. und Furie, K. L.: Carotid endarterectomy revisited. *N Engl J Med* 2000; 342(23): 1743-5.
  72. Kita T, Kume N, Minami M, Hayashida K, Murayama T, Sano H, Moriwaki H, Kataoka H, Nishi E, Horiuchi H, Arai H, Yokode M. Role of oxidized LDL in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 2001, 947:199-205.
  73. Klinke R, Silbernagl S. *Lehrbuch der Physiologie*. 4. Auflage, Thieme 2005.
  74. Koller KJ, Lowe DG, Bennett GL, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, Goeddel DV: Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). *Science* 1991; 252:120-123.
  75. Kolominsky-Rabas, P. L. und Heuschmann, P. U.: Incidence, etiology and long-term prognosis of stroke. *Fortschr Neurol Psychiatr* 2002; 70(12): 657-62.
  76. Krieger M. The other side of scavenger receptors: pattern recognition for host defense. *Curr Opin Lipidol* 1997; 8:275-280.
  77. Kubo A, Isumi Y, Ishizaka Y, Tomoda Y, Kangawa K, Dohi K, Matsuo H, Minamino N. C-Type natriuretic peptide is synthesized and secreted from leukemia cell lines, peripheral blood cells, and peritoneal macrophages. *Exp*

- 
- Hematol 2001; 29:609-615.
78. Kuehnl A, Pelisek J, Bruckmeier M, Safi W, Eckstein HH. Comparative measurement of CNP and NT-proCNP in human blood samples: a methodological evaluation. Submitted 2012.
  79. Kuehnl A, Pelisek J, Tian W, Kuhlmann M, Rolland PH, Mekkaoui C, Fuchs A, Nikol S. C-type natriuretic peptide inhibits constrictive remodeling without compromising re-endothelialization in balloon-dilated renal arteries. *J Endovasc Ther* 2005 Apr; 12(2):171-82.
  80. LaPointe MC. Molecular regulation of the brain Natriuretic peptide gene. *Peptides* 2005; 26:944-956.
  81. Lei XJ, Ma AQ, Xi YT, Zhang W, Yao Y, Du Y. Expression of Kir2.1 channel during differentiation of human macrophages into foam cells. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*. 2005 Dec; 25(12):1461-7.
  82. Levitan I, Volkov S, Subbaiah PV. Oxidized LDL: diversity, patterns of recognition, and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal* 2010; 13:39-75.
  83. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420(6917):868-874.
  84. Lisi S, Sisto M, Lofrumento DD, D'Amore S, D'Amore M. Advances in the understanding of the Fc gamma receptors-mediated autoantibodies uptake. *Clin Exp Med* 2011;11:1-10.
  85. Lohmann-Matthes ML. Der Makrophage. *Biologie in unserer Zeit* 1981; 5:135-14.
  86. Luft FC. Molecular genetics of human hypertension. *J Hypertens* 1998; 16:1871-1878.
  87. Lund PK, Joo GB, Westvik AB, Ovstebo R, Kierulf P. Isolation of monocytes from whole blood by density gradient centrifugation and counter-current elutriation followed by cryopreservation: six years experience. *Scand J Clin Lab Invest* 2000; 60:357-365.
  88. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407:233-241.
  89. Maack T, Suzuki M, Almeida FA, Nussenzveig D, Scarborough RM, McEnroe GA, Lewicki JA. Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. *Science* 1987; 238:675-678.
  90. Mair J. Biochemistry of B-type natriuretic peptide--where are we now? *Clin Chem Lab Med*. 2008; 46(11):1507-14.
  91. Mao SY. Conjugation of fluorochromes to antibodies. *Methods Mol Biol* 1999; 115:35-38.



- 
92. Martens JS, Lougheed M, Gomez-Munoz A, Steinbrecher UP. A modification of apolipoprotein B accounts for most of the induction of macrophage growth by oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1999; 274:10903-10910.
  93. Martens JS, Reiner NE, Herrera-Velit P, Steinbrecher UP. Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in the induction of macrophage growth by oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1998; 273:4915-4920.
  94. Matic M und Sanford RS. Tumor Necrosis Factor Release from Lipopolysaccharide-stimulated human Monocytes: Lipopolysaccharide Tolerance in Vitro. *Cytokine*. November 1991; 3:576-583.
  95. Matsukawa N, Grzesik WJ, Takahashi N, Pandey KN, Pang S, Yamauchi M, Smithies O. The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; 96:7403-7408.
  96. Mayerl C, Lukasser M, Sedivy R, Niederegger H, Seiler R, Wick G. Atherosclerosis research from past to present - on the track of two pathologists with opposing views, Carl von Rokitansky and Rudolf Virchow. *Virchows Arch*. 2006; 449:96-103.
  97. Mayerl C, Prelog M. Immunosenscence and juvenile idiopathic arthritis. *Autoimmun Rev.* 2012 Mar;11(5):297-300.
  98. McGrath MF, de Bold ML, de Bold AJ. The endocrine function of the heart. *Trends Endocrinol Metab* 2005; 16(10):469-477.
  99. Mestas J, Ley K. Monocyte-Endothelial Cell Interactions in the Development of Atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 2008; 18:228-232.
  100. Mikita T, Porter G, Lawn RM, Shiffman D. Oxidized low density lipoprotein exposure alters the transcriptional response of macrophages to inflammatory stimulus. *J Biol Chem* 2001; 276(49): 45729-39.
  101. Miller YI, Chang MK, Binder CJ, Shaw PX, Witztum JL. Oxidized low density lipoprotein and innate immune receptors. *Curr Opin Lipidol* 2003; 14:437-45.
  102. Miller YI, Viriyakosol S, Binder CJ, Feramisco JR, Kirkland TN, Witztum JL. Minimally modified LDL binds to CD14, induces macrophage spreading via TLR4/MD-2, and inhibits phagocytosis of apoptotic cells. *The Journal of biological chemistry* 2003; 278:1561-8.
  103. Ming L, Jing L, Zhixiao W, Shaolin H, Xuming M. Oxidized Low-density Lipoprotein-induced Proinflammatory Cytokine Response in Macrophages are Suppressed by CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells Through Downregulating Toll Like Receptor 2-mediated Activation of NF- $\kappa$ B. *Cell Physiol Biochem* 2010; 25:649-656.

- 
104. Mitkiewicz M, Kuropatwa M, Kurowska E, Gorczyca WA. Different effects of soluble and particulate guanylyl cyclases on expression of inflammatory cytokines in rat peripheral blood mononuclear cells. *Immunobiology* 2011; 216(3):423-430.
  105. Miyoshi M, Watanabe T. Role of anterior hypothalamic natriuretic peptide in lipopolysaccharide-induced fever in rats. *Eur J Appl Physiol* 2010; 109:49-57.
  106. Mizuno K, Toma T, Tsukiji H, Okamoto H, Yamazaki H, Ohta K, Kasahara Y, Koizumi S, Yachie A. Selective expansion of CD16<sup>high</sup>CCR2<sup>-</sup> subpopulation of circulating monocytes with preferential production of haem oxygenase (HO)-1 in response to acute inflammation. *Clin Exp Immunol* 2005; 142:461-70.
  107. Molnarfi N, Gruaz L, Dayer JM, Burger D. Opposite regulation of IL-1 beta and secreted IL-1 receptor antagonist production by phosphatidylinositide-3 kinases in human monocytes activated by lipopolysaccharides or contact with T-cells. *J Immunol* 2007; 178:446-454.
  108. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol Methods* 1983; 65:55-63.
  109. Munker R, Gasson J, Ogawa M und Koeffler HP. Recombinant human tumor necrosis factor induces production of granulocyte-monocyte colony stimulating factor. *Nature* 1986; 323:79-82.
  110. Napoli C, D'Amiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, Palinski W. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1997; 100:2680-2690.
  111. Neurauter AA, Bonyhadi M, Lien E, Noekleby L, Ruud E, Camacho S, Aarvak T. Cell isolation and expansion using Dynabeads. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2007; 106:41-73.
  112. Newby AC. Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28(12): 2108-14.
  113. Nishikimi T, Kuwahara K, Nakao K. Current biochemistry, molecular biology, and clinical relevance of natriuretic peptides. *J Cardiol* 2011; 57(2):131-140.
  114. Ohashi R, Mu H, Yao Q, Chen C. Atherosclerosis: immunopathogenesis and immunotherapy. *Med Sci Monit* 2004; 10:255-260.
  115. Old LJ. Tumor necrosis Factor (TNF). *Science* 1985; 230:630-632.
  116. Oliveira FLC, Patin RV, Escrivao MA. Atherosclerosis prevention and treatment in children and adolescents. *Expert Review of Cardiovascular Therapy* 2010;

---

8(4):513-528.

117. Ono K, Mannami T, Baba S, Tomoike H, Suga S, Iwai N. A single-nucleotide polymorphism in C-type natriuretic peptide gene may be associated with hypertension. *Hypertens Res* 2002; 25(5):727-730.
118. Pagel-Langenickel I, Buttgereit J, Bader M, Langenickel TH. Natriuretic peptide receptor B signaling in the cardiovascular system: protection from cardiac hypertrophy. *J Mol Med* 2007 Aug; 85(8):797-810.
119. Pandey KN. Biology of Natriuretic peptides and their receptors. *Peptides* 2005; 26(6):901-932.
120. Pandey KN. Emerging Roles of Natriuretic Peptides and their Receptors in Pathophysiology of Hypertension and Cardiovascular Regulation. *J Am Soc Hypertens* July 2008; 2(4):210-226.
121. Papaioannou TG, Karatzis EN, Vavuranakis M, Lekakis JP, Stefanadis C. Assessment of vascular wall shear stress and implications for atherosclerotic disease. *Int J Cardiol* 2008; 113:12-18.
122. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 2001; 22:153-183.
123. Pelisek J, Fuchs AT, Kuehnl A, Tian W, Kuhlmann MT, Rolland PH, Mekkaoui C, Gaedtke L, Nikol S. C-type natriuretic peptide for reduction of restenosis: gene transfer is superior over single peptide administration. *J Gene Med* 2006 Jul;8(7):835-44.
124. Pelisek J, Kuehnl A, Rolland PH, Mekkaoui C, Fuchs A, Walker GF, Ogris M, Wagner E, Nikol S. Functional analysis of genomic DNA, cDNA, and nucleotide sequence of the mature C-type natriuretic peptide gene in vascular cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(9):1646-51.
125. Perez de Diego R, Lopez-Granados E, Pozo M, Rodriguez C, Sabina P, Ferreira A, Fontan G, Garcia-Rodriguez MC, Alemany S. Bruton's tyrosine kinase is not essential for LPS-induced activation of human monocytes. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 117:1462-1469.
126. Perez-Perez GI, Sheperd VL, Morrow JD, BLaser MJ. Activation of human THP-1 cells and rat bone marrow-derived macrophages by *Helicobacter Pylori* lipopolysaccharide. *Infect Immun* 1995; 63(4):1183- 1187.
127. Pixley FJ, Stanley ER. CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. *Trends Cell Biol* 2004; 14(11): 628-638.
128. Potter LR. Natriuretic peptide metabolism, clearance and degradation. *FEBS J* 2011; 278:1808-1817.

- 
129. Prakash, Saha, Moderai B, Humphries J, Mattock K, Waltham M, Burnand KG, Smith A. The monocyte/macrophage as a therapeutic target in atherosclerosis. *Current Opinion in Pharmacology*. Februar 2009; 109-118.
  130. Qin Zhenyu. The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis* 2012; 221(1): 2-11.
  131. Qiu G, Ho AC, Yu W, Hill JS. Suppression of endothelial or lipoprotein lipase in THP-1 macrophages attenuates proinflammatory cytokine secretion. *J Lipid Res* 2007; 48:385-394.
  132. Rader DJ und Puré E. Lipoproteins, macrophage function, and atherosclerosis: Beyond the foam cell. *Cell Metabolism* 2005; 223-230.
  133. Radhika A, Sudhakaran PR. Upregulation of macrophage-specific functions by oxidized LDL: lysosomal degradation-dependent and –independent pathways. *Moll Cell Biochem* 2012; Sep 30.
  134. Reape T J und Groot PHE. Chemokines and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1999; 147:213-225.
  135. Rinne H. Taschenbuch der Statistik. 4th ed. Frankfurt am Main. Wissenschaftlicher Verlag Harri Deutsch GmbH; 2008.
  136. Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: proliferation of the smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* 1973; 180:1332-1339.
  137. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362:801-809.
  138. Ross, R.: Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-26
  139. Schulz S. C-type Natriuretic peptide and guanylyl cyclase B Receptor. *Peptides* 2005; 26(6):1024-1034.
  140. Scotland RS, Ahluwalia A und Hobbs AJ. C-Type natriuretic peptide in vascular physiology and disease. *Pharmacology & Therapeutics* 2005; 105:85-93.
  141. Sellitti DF, Koles N, Mendonca MC. Regulation of C-type natriuretic peptide expression. *Peptides* 2011; 32:1964-1971.
  142. Sirover MA. On the functional diversity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: biochemical mechanisms and regulatory control. *Biochem Biophys Acta* 2011; 1810(8):741-751.
  143. Soeki T, Kishimoto I, Okumura H, Tokudome T, Horio T, Mori K, Kangawa K. C-Type Natriuretic Peptide, a novel antifibrotic and antihypertrophic agent,

- 
- prevents cardiac remodeling after myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005; 45:608-616.
144. Statistisches Bundesamt Deutschland 2010. Todesursachen in Deutschland – Fachserie 12 Reihe 4 – 2010. SFG Servicecenter-Fachverlage.
  145. Steinmetz M, Potthast R, Sabrane K, Kuhn M. Diverging vasorelaxing effects of C-type natriuretic peptide in renal resistance arteries and aortas of GC-A-deficient mice. *Regul Pept* 2004; 119(1-2):31-37.
  146. Stemme S, Faber B, Holm J, Wiklund O, Witztum JL, Hansson GK. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Apr 25; 92(9):3893-7.
  147. Stingo AJ, Clavell AL, Heublein DM, Wei CM, Pittelkow MR, Burnett Jr. JC. Presence of C-Type natriuretic peptide in cultured human endothelial cells and plasma. *Am J Physiol* 1992; 263(4 Pt 2):H1318-H1321.
  148. Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1990 Apr 30; 168(2):863-70.
  149. Suga S, Itoh H, Komatsu Y, Ogawa Y, Hama N, Yoshimasa T, Nakao K. Cytokine-induced C-type Natriuretic peptide (CNP) secretion from vascular endothelial cells-evidence for CNP as a novel autocrine/paracrine regulator from endothelial cells. *Endocrinology* 1993; 133(6):3038-3041.
  150. Sugiyama S, Kugiyama K, Matsumura T, Suga S, Itoh H, Nakao K, Yasue H. Lipoproteins regulate C-type natriuretic peptide secretion from cultured vascular endothelial cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 1995; 15:1968-1974.
  151. Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, Ueda O, Sakaguchi H, Higashi T, Suzuki T, Takashima Y, Kawabe Y, Cynshi O, Wada Y, Honda M, Kurihara H, Aburatani H, Doi T, Matsumoto A, Azuma S, Noda T, Toyoda Y, Itakura H, Yazaki Y, Kodama T. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 1997; 386:292-296.
  152. Tacke F, Alvarez D, Kaplan TJ, Jakubzick C, Spanbroek R, Llodra J, Garin A, Liu J, Mack M, van Rooijen N, Lira SA, Habenicht A, Randolph GJ. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *The Journal of clinical investigation*. January 2007; 117:185-194.
  153. Takatsuki F, Okano A, Suzuki C, Chieda R, Takahara Y, Hirano T, Kishimoto T, Hamuro J und Akiyama Y. Human recombinant IL-6/B cell stimulatory factor 2 augments murine antigen-specific antibody responses in vitro and in vivo. *J Immunol* 1988; 141:3072-3077.

- 
154. Takei Y. Does the Natriuretic peptide system exist throughout the animal and plant kingdom? *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2001; 129(2-3):559-573.
  155. Taketa K, Matsumura T, Yano M, Ishii N, Senokuchi T, Motoshima H, Murata Y, Kim-Mitsuyama S, Kawada T, Itabe H, Takeya M, Nishikawa T, Tsuruzoe K, Araki E. Oxidized low density lipoprotein activates peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha) and PPARgamma through MAPK-dependent COX-2 expression in macrophages. *J Biol Chem* 2008; 283(15): 9852-9862.
  156. Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* 2006; 86:515-81.
  157. Terkeltaub R, Banka CL, Solan J, Santoro D, Brand K, Curtiss LK. Oxidized LDL induces monocytic cell expression of interleukin-8, a chemokine with T-lymphocyte chemotactic activity. *Arterioscler Thromb* 1994; 14:47-53.
  158. Thomas G. Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3(10):753-766.
  159. Tremblay J, Desjardins R, Hum D, Gutkowska J, Hame P. Biochemistry and physiology of the Natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase. *Mol Cell Biochem* 2002; 230:31-47.
  160. Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 1980; 26(2):171-6.
  161. Van Berkel TJ, Out R, Hoekstra M, Kuiper J, Biessen E, van Eck M. Scavenger receptors: friend or foe in atherosclerosis? *Curr Opin Lipidol* 2005; 16:525-535.
  162. Vijayan D. Isolation and differentiation of monocytes-macrophages from human blood. *Methods Mol Biol* 2012; 844:183-187.
  163. Villar IC, Panayiotou CM, Sheraz A, Madhani M, Scotland RS, Nobles M, Kemp-Harper B, Ahluwalia A, Hobbs AJ. Definitive role for natriuretic peptide receptor-C in mediating the vasorelaxant activity of C-type natriuretic peptide and endothelium-derived hyperpolarising factor. *Cardiovasc Res* 2007; 74:515-525.
  164. Vollmar AM, Gerbes AL, Nemer M, Schulz R. Detection of C-type natriuretic peptide (CNP) transcript in the rat heart and immune organs. *Endocrinology* 1993; 132(4):1872-1874.
  165. Vollmar AM, Schulz R. Expression and differential regulation of natriuretic peptides on mouse macrophages. *J Clin Invest* 1995; 95:2442-2450.
  166. Weber C, Schober A und Zerneck A. Chemokines: Key Regulators of

- 
- Mononuclear Cell Recruitment in Atherosclerotic Vascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1997-2008.
167. Welsch U. *Sobotta Lehrbuch Histologie*. 2.Auflage. Urban & Fischer 2005
  168. Wiame I, Remy S, Swennen R, Sagi L. Irreversible heat inactivation of DNase I without RNA degradation. *Bio Techniques* 2000; 29(2):252-256.
  169. Wick G, Knoflach M, Xu Q. Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *Annual Review Immunology* 2004; 22:361-403.
  170. Wiley KE, Davenport AP. Physiological antagonism of endothelin-1 in human conductance and resistance coronary artery. *Br J Pharmacol* 2001; 133(4):568-574.
  171. Woollard KJ und Geissmann F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nat Rev Cardiol* 2010; 7(2):77.
  172. Wu C, Wu F, Pan J, Morser J, Wu Q. Furin-mediated processing of Pro-C-type Natriuretic peptide. *J Biol Chem* 2003; 278(28):25847-25852.
  173. Wu J, Zhou J, Chen X, Fortenbery N, Eksioglu EA, Wie S, Dong J. Attenuation of LPS-induced inflammation by ICT, a derivate of icariin, via inhibition of the CD14/TLR4 signaling pathway in human monocytes. *Int Immunopharmacol* 2012; 12(1):74-79.
  174. Yamamoto K, Ikeda U, Shimada K. Role of mechanical stress in monocytes/macrophages: implications for atherosclerosis. *Curr Vasc Pharmacol* 2003; 1:315-319.
  175. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S.: Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study). *Lancet* 2004; 364(9438): 937-952.
  176. Zernecke A und Weber C. Chemokines in the vascular inflammatory response of atherosclerosis. *Cardiovascular Research*. 2010; 86:192-201.
  177. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*. 1992 Oct 16;258(5081):468-71.
  178. Zhou L, Somasundaram R, Nederhof RF, Dijkstra G, Faber KN, Peppelenbosch MP, Fuhler GM. Impact of human granulocyte isolation procedures on functional studies. *Clin Vaccine Immunol* 2012; 19(7):1065-1074.
  179. Ziegler-Heitbrock HW. Definition of human blood monocytes. *J Leukoc Biol* 2000; 67:603-606.
  180. Zipper H, Brunner, Bernhagen J, Vitzthum F. Investigations on DNA

---

intercalation and surface binding by SYBR Green I, ist structure determination and methodological implications. Nucleic Acids Res 2004; 32(12):e103.



---

## 7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholin
AK	Antikörper
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BNP	Brain natriuretic Peptide
bzw.	beziehungsweise
cANF <sup>4-23</sup>	synthetischer atrialer natriuretischer Faktor
C°	Grad Celsius
CCR	Chemokinrezeptor
CD	Cluster of differentiation / Differenzierungsfaktor
cDNA	copy desoxyribonucleic acid / komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGK	cGMP dependent kinase
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CNP	Natriuretisches Peptid Typ-C
CX3CR1	Chemokinrezeptor 1 - CX3
DAG	Diacylglycerin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	fluorescence activated cell sorting / Durchflusszytometrie
FGF	Fibroblast Growth Factor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenas

---

GC	Guanylatcyclase
GIRK	G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels
g	Gramm
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
HDL	High density Lipoprotein
HE	Hämatoxylin Eosin
ICAM	intercellular adhesion molecule
IL-1 $\beta$	Interleukin 1 $\beta$
IL-6	Interleukin 6
IP-3	Inositoltriphosphat
KHK	Koronare Herzkrankheit
LBP	Lipopolysaccharid bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
LSAB	Labelled (Strept-)Avidin-Biotin-Methode
M-CSF	Macrophage colony stimulating factor
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex / Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
ml	Milliliter
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MPS	Mononukleär phagozytäres System
MSR-1	Macrophage scavenger receptor 1
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NF- $\kappa$ B	nuclear factor kappa B
NP	natriuretisches Peptid
NPR-2	Natriuretic Peptide Receptor-2
NPR-3	Natriuretic Peptide Receptor-3

---

NTproBNP	N-terminales pro-Brain natriuretisches Peptid
oxLDL	Oxidiertes Low density Lipoprotein
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
pAVK	Periphere Arterielle Verschlusskrankheit
PBC	peripheral blood cell
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGF	Platelet derived growth factor
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PRR	Pattern Recognition Receptor
RES	Retikuloendotheliales System
RMPI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Radikale Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
qRT-PCR	quantitative Realtime Polymerase Kettenreaktion
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
Tab.	Tabelle
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TGF- $\beta$	Transforming growth factor
TLR-4	Toll-like Rezeptor 4
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor-alpha
usw.	und so weiter
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VEGF	Vascular endothelial growth factor

---

z. B.                      zum Beispiel

## **8. Danksagung**

---

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. H.-H. Eckstein, Direktor der Klinik und Poliklinik für Vaskuläre und Endovaskuläre Chirurgie der Technischen Universität München, für die Übernahme der Schirmherrschaft über dieses Projekt. Auch möchte ich mich für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und Geräte bedanken.

Der größte Dank geht an Herrn Dr. med. Andreas Kühnl, der mir das Vertrauen geschenkt hat dieses Thema zu bearbeiten und der durch sein Engagement und seine freundschaftliche Förderung am meisten zum Zustandekommen dieser Dissertation beigetragen hat. Bedanken möchte ich mich im Besonderen für die hervorragende Betreuung, die unermüdliche Geduld und Hilfsbereitschaft, sowie das mühevoll Korrekturlesen.

Ein großer Dank gebührt auch Herrn PD. Dr. Jaroslav Pelisek für die freundliche Aufnahme in seinem Forschungslabor, sowie für die großartige Einarbeitung und Unterstützung bei der praktischen Durchführung des Projektes. Desweiteren möchte ich mich auch bei Frau Renate Hegenloh und Frau Dr. Mihaela Culmes bedanken, die mich bei den Experimenten mit Rat und Tat und einer sehr großen Hilfsbereitschaft unterstützt haben.

Meinen Eltern, Regina und Lothar Bruckmeier möchte ich diese Arbeit widmen und mich für die liebevolle Unterstützung bedanken, die sie mir zukommen haben lassen.