

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin III, Schwerpunkt: Kardiologie und
Kreislaufkrankungen**

**Rolle der BMPs bei der Differenzierung von Monozyten zu
Makrophagen/Schaumzellen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Buchal, Thomas Robert

2018

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. I. Müller
2. Berichterstatter: Professor Dr. H. R. Salih

Tag der Disputation: 16.04.2018

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	3
1.1 Atherosklerose	3
1.2 Monozytendifferenzierung zu Makrophagen und Schaumzellen	6
1.3 Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)	10
1.4 Interaktionen der BMPs mit anderen Proteinen	14
1.5 BMP2	16
1.6 BMP4	17
1.7 BMP7	19
1.8 Fragestellung.....	21
2. Material und Methoden	22
2.1 Material.....	22
2.1.1 Geräte	22
2.1.2 Zellkulturen	23
2.1.3 Puffer und Lösungen.....	25
2.1.4 Proteine	26
2.1.5 Zytokin Array	26
2.1.6 Software	27
2.2 Methoden	28
2.2.1 Anlegen der Zellkulturen.....	28
2.2.2 Zytokin Array	34
2.2.3 statistische Auswertung	38
3. Ergebnisse.....	39

3.1 Einfluss von BMP2, BMP4 und BMP7 auf die quantitative Entstehung von Makrophagen/Schaumzellen.....	39
3.1.1 Versuchsaufbau.....	39
3.1.2. Vergleich der Monozyten-Monokultur mit der Monozyten-Thrombozyten-Kokultur	40
3.1.3 Einfluss von BMP2, BMP4, BMP7 auf die Entstehung von Makrophagen/Schaumzellen aus Monozyten	42
3.2 Zytokin Array	54
3.2.1. Ergebnisse des Zytokin Arrays	56
4. Diskussion.....	61
4.1 Rolle der Schaumzellen und von MIF und Gremlin-1 im Rahmen der Atherosklerose.....	61
4.2 Einfluss von BMP 2, BMP4 und BMP7 auf die Entstehung von Makrophagen und Schaumzellen in vitro	62
4.3 Einfluss der Interaktion von Gremlin-1 und BMPs auf die Entstehung von Makrophagen und Schaumzellen in vitro	63
4.4 Einfluss der Interaktion von MIF, Gremlin-1 und BMPs auf die Entstehung von Makrophagen und Schaumzellen in vitro	64
4.5 Zytokinexpression von Makrophagen/Schaumzellen in vitro .	65
4.6 Limitationen der Arbeit	68
4.7 Schlussfolgerung	69
5. Zusammenfassung	70
6. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	71
7. Literaturverzeichnis	73
8. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift.....	85
9. Danksagung	86

10. Lebenslauf87

Abkürzungsverzeichnis

acLDL	acetyliertes low-density-Lipoprotein
ALK	activin receptor-like kinase
BAMBI	BMP and activin membrane-bound inhibitor
BMP2	bone morphogenetic protein 2
BMP4	bone morphogenetic protein 4
BMP7	bone morphogenetic protein 7
CD	cluster of differentiation
COX	Cyclooxygenase
DAN	deadenylating nuclease
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
FCS	fetal calf serum
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
Grem1	Gremlin-1
HCC	hepatocellular carcinoma
HDL	high-density Lipoprotein
ICAM-1	intracellular adhaesion molecule-1
IL	Interleukin
JNK	C-Jun-N-terminale-Kinase
LOX-1	lektin-like ox-LDL Rezeptor
MAP	mitogen-activated protein
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
MGP	matrix G1a Protein
MHC II	major histocompatibility complex II
MIF	macrophage-migration-inhibition-factor
MIP-1 delta	macrophage inflammatory protein-1 delta
MIP-3 alpha	macrophage inflammatory protein-3 alpha
NADPH	nicotinamine adenine dinucleotide phosphate-oxidase
NAP-2	neutrophil activating protein-2
Nrf-2	nuclear factor-2

oxLDL	oxidiertes low-density-Lipoprotein
PBS	phosphate buffered saline
PDGF	platelet-derived growth factor
PPAR γ	peroxisome proliferator-activated-receptor γ
PRDC	protein related to DAN and Cerberus
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
RANTES	Regulation on Activation, Normal T Expressed and Secreted
ROS	reactive oxygen species
SMC	smooth muscle cell
TF	tissue factor
TGF- β	transforming growth factor β
TNF α	tumor necrosis factor α
USAG-1	uterine sensitization associated gene-1
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VLA-4	very late antigen-4

1. Einleitung

1. Einleitung

1.1 Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung mittlerer und großer Arterien ¹, deren Ätiologie sehr vielfältig ist. Bei der Entstehung spielen einerseits Faktoren eine Rolle, zu deren Genese eine genetische Prädisposition beiträgt, wie beispielsweise hohe low-density lipoprotein (LDL)- und niedrige high-density lipoprotein (HDL)-Werte, Diabetes mellitus, Übergewicht und Bluthochdruck, andererseits aber auch Umweltfaktoren wie Rauchen und Bewegungsmangel ². Pathophysiologisch kommt es zu Läsionen des Endothels, und zwar besonders an den Stellen der Gefäße, an denen der Blutfluss nicht laminar, sondern turbulent ist ³⁻⁴. Im Zuge dessen können endotheliale Dysfunktionen entstehen, die zum einen die Migration von Monozyten und T-Lymphozyten erhöhen und zum anderen Bestandteilen des Blutes wie Lipoproteinen und anderen Plasmaproteinen ermöglichen, an diesen Stellen das Gefäßlumen zu verlassen und in die Intima des Gefäßes vorzudringen ⁵⁻⁶. Durch diese Läsionen gelangt LDL in die Intima und wird modifiziert (v.a oxidiert), wodurch es diverse chemotaktische und pro-inflammatorische Wirkungen entfaltet.

Eine dieser Wirkungen ist, dass die Produktion von MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) durch Endothelzellen deutlich erhöht wird, was zur Folge hat, dass vermehrt Monozyten angezogen werden ⁷. Auch die Expression von GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor) wird gesteigert, sodass sich die eingewanderten Monozyten vermehrt zu Makrophagen differenzieren und proliferieren ⁸. Außerdem werden durch M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) auf Makrophagen deutlich mehr Scavenger-Rezeptoren exprimiert, über die oxidiertes LDL aufgenommen wird, wodurch es zur Schaumzellbildung kommt ⁹. Erst durch die Oxidation von LDL kommt es zu einer Akkumulation in diesen Makrophagen, natives LDL hingegen wird nicht vermehrt aufgenommen ¹⁰⁻¹¹. Aufgrund der Oxidation erhält LDL außerdem eine zytotoxische Komponente, welche zu einer Schädigung von Endothelzellen führt ¹². Diese Schaumzellen bilden mit den ebenfalls in der Intima vorhandenen T-Zellen in der Frühphase der Atherosklerose sogenannte „fatty-streak“ Läsionen ¹³.

1. Einleitung

Zusätzlich zu den Monozyten und T-Lymphozyten wandern glatte Muskelzellen in den betroffenen Gebieten von der Media in die Intima ein, die durch die von Endothelzellen produzierten Wachstumsfaktoren wie platelet-derived growth factor (PDGF) angezogen und zur Proliferation stimuliert werden^{9, 14}. Diese glatten Muskelzellen produzieren extrazelluläre Matrix (beispielsweise Kollagen), die sich luminal als Plaque über den Makrophagen und Schaumzellen ausbreitet und die Gefäßwand verdickt.

Weitere entscheidend an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligte Enzyme sind die Metalloproteinasen, die für den Abbau von extrazellulärer Matrix verantwortlich sind und von Makrophagen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen gebildet werden⁹. Im gesunden Körper halten sie den Auf- und Abbau dieser Matrix in Homöostase, in atheromatösen Plaques konnte jedoch eine erhöhte Expression von Metalloproteinasen nachgewiesen werden¹⁵⁻¹⁶.

Kommt es im Verlauf zu einem Untergang der Schaumzellen, hat das zur Folge, dass große Mengen an LDL aus dem Zellinneren freigesetzt werden und sich nun extrazellulär in der Intima zusammenlagern. Eine effiziente Efferozytose (Abbau abgestorbener Zellen durch Makrophagen) findet nicht mehr statt, da diese zwar vermehrt chemotaktisch angezogen werden, den Bereich der geschädigten Gefäßwand jedoch nicht mehr verlassen können. Das extrazelluläre LDL bildet zusammen mit den abgestorbenen Zellüberresten den sogenannten „necrotic core“ des Plaques¹⁷. Aufgrund einer verstärkten Aktivität der Metalloproteinasen kann es durch Matrixdegradation zu einer Ruptur dieses luminalen Teils der Plaque, der sogenannten fibrösen Kappe, kommen, der den „necrotic core“ bisher überdeckt hat. Da dieser unter anderem tissue factor erhält, der eine prothrombotische Wirkung hat, kommt es bei Kontakt mit Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten zur Thrombusbildung⁶. Abhängig von der Größe des entstandenen Thrombus kann dieser zu einem kompletten Gefäßverschluss führen.

1. Einleitung

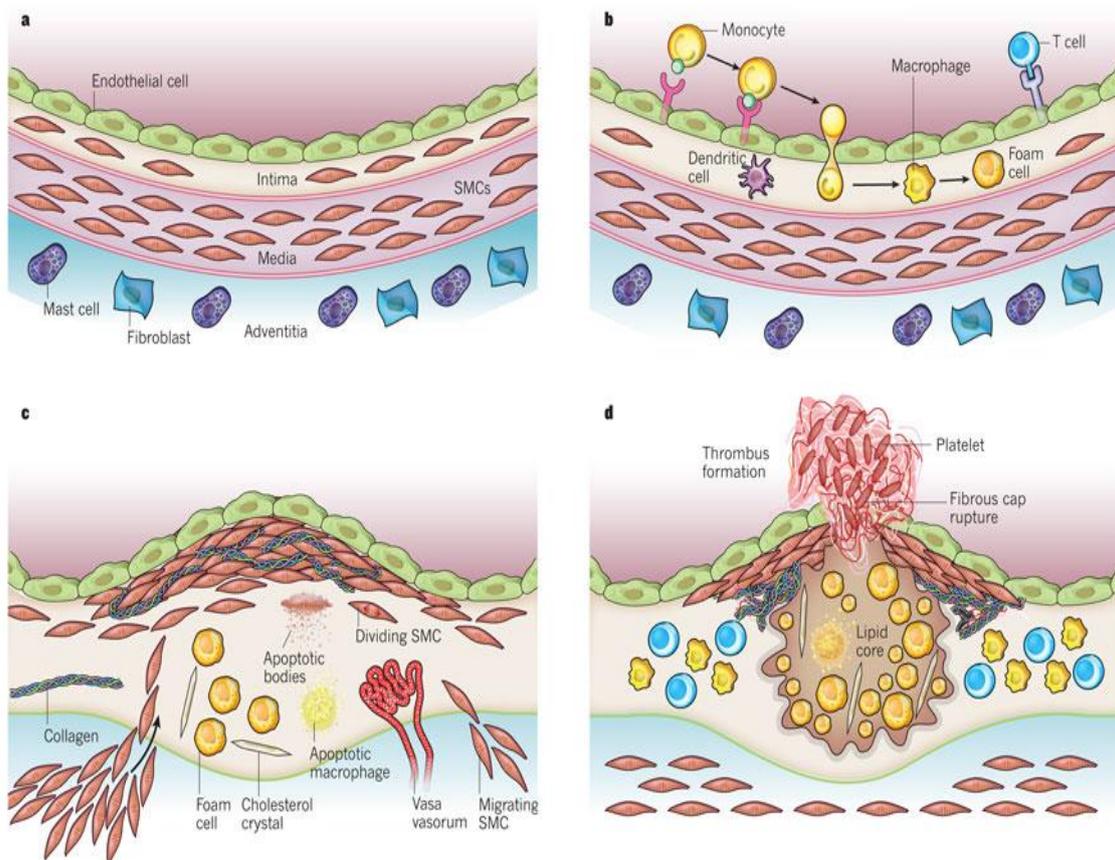


Abbildung 1: schematischer Ablauf der Atherosklerose¹⁴ : **a)** dargestellt ist schematisch ein physiologischer Aufbau einer arteriellen Gefäßwand. Man erkennt die dreigeteilte Wandstruktur mit Intima, Media und Adventitia. In der Media und vereinzelt in der Intima sind glatte Muskelzellen (smooth muscle cells, SMC) abgebildet. **b)** in der Frühphase der Entstehung einer Atherosklerose werden zunächst Leukozyten, vor allem Monozyten, gebunden, die dann in die Intima wandern. Anschließend differenzieren sich die Monozyten zu Makrophagen und einige durch Aufnahme von LDL weiter in Schaumzellen (foam cell). **c)** im Verlauf kommt es zu einer verstärkten Einwanderung der glatten Muskelzellen in die Intima und der Bildung von extrazellulärer Matrix. Abgestorbene Zellen (Makrophagen und Muskelzellen) werden nicht mehr ausreichend abgebaut und ihre Überreste akkumulieren und bilden den „necrotic core“. **d)** aufgrund einer Ruptur der fibrösen Kappe kommt der lipidreiche Kern, der unter anderem Tissue Factor enthält, mit Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten in Kontakt, sodass sich ein Thrombus bildet.

1. Einleitung

1.2 Monozytendifferenzierung zu Makrophagen und Schaumzellen

Monozyten und Makrophagen sind Bestandteile des menschlichen Immunsystems und tragen zur angeborenen, wie auch zur erworbenen Immunantwort bei. Im menschlichen Organismus wurden verschiedene Arten von Monozyten entdeckt. Während 80-90% der Monozyten CD16⁻ sind, viele CCR2 Rezeptoren auf ihrer Oberfläche besitzen und vor allem das anti-inflammatorische Zytokin Interleukin-10 ausschütten, zeichnen sich die übrigen CD16⁺ Monozyten durch die Erzeugung proinflammatorischer Zytokine aus¹⁸. Im Zuge der Atherosklerose wandern Monozyten in die Intima ein, da auf der geschädigten Gefäßwand unter anderem P- und E-Selektine exprimiert werden, die Liganden auf den Monozyten wie P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) binden, wodurch es zur Adhäsion kommt¹⁹. Zudem wird durch diese Bindung die Aktivität von Integrinen auf den Monozyten erhöht, wobei hier vor allem das very late antigen-4 (VLA-4) eine entscheidende Rolle inne hat. Auf der Gefäßwand ist unter inflammatorischen Bedingungen vermehrt vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) vorhanden, das von den Integrinen erkannt und gebunden wird. Abhängig von der Affinität des VLA-4 wird damit entweder das Rollen der Monozyten auf der Gefäßwand verlangsamt oder es kommt bei höherer Affinität direkt zur Bindung²⁰. Nach dem Eindringen in die Intima der Gefäßwand erfolgt die Differenzierung der Monozyten. Dabei ist eine Differenzierung in verschiedene Arten von Makrophagen, sowie in dendritische Zellen möglich. Kommt es zu einer Zellreifung zu Makrophagen, so wird im Verlauf dieser Reifung stetig mehr CD68 Antigen auf der Oberfläche präsentiert²¹. Klassischerweise werden die Makrophagen in M1 und M2 Makrophagen unterteilt²², auch wenn inzwischen bekannt ist, dass diese Einteilung den vielen verschiedenen Phänotypen nur bedingt gerecht wird. So setzt sich vor allem die Gruppe der M2 Makrophagen aus vielen Phänotypen mit unterschiedlichen Wirkungen zusammen²³. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich einige Makrophagen im Rahmen der Atherosklerose unter Expression des nuclear factor-2 (Nrf-2) verändern und eine neue Art (Mox) bilden²⁴. Die Entwicklung hin zu M1 Makrophagen, die ebenso als klassischer Weg bezeichnet wird, wird vor allem von Interferon- γ initiiert, wohingegen der alternative Weg zur Entstehung von M2 Makrophagen von IL4, IL13, IL1 und Vitamin D3 unterstützt wird²⁵. Auch der peroxisome proliferator-activated-receptor γ (PPAR γ) führt dazu, dass vermehrt M2-Makrophagen gebildet werden²⁶. Makrophagen können jedoch zwischen der M1 und

1. Einleitung

der M2 Gruppe wechseln, sind also nicht nach einmaliger Differenzierung an einen Typ gebunden²⁷. M1 Makrophagen schütten vor allem Zytokine aus, die einen entzündlichen Vorgang befördern. Dazu zählen unter anderem tumor necrosis factor α (TNF α), IL6 und IL12²⁸. Zudem wird verstärkt major histocompatibility complex II (MHC II) exprimiert²⁹. M2 Makrophagen hingegen sind als eine Art Gegenspieler zum M1 Typ an der Regulation der Entzündung beteiligt, in dem sie Zytokine wie IL10 und transforming growth factor β (TGF- β) produzieren, die antiinflammatorisch wirken³⁰. Außerdem fördern sie auch die Wundheilung³¹.

In atheromatösen Plaques sind Makrophagen beider Hauptgruppen zu finden³². Wie in 1.1 beschrieben, trägt die Schaumzellentwicklung in der Frühphase der Atherosklerose zur Entstehung dieser bei. Schaumzellen entstehen durch übermäßige Aufnahme von oxLDL bei gleichzeitig nicht ausreichendem Abbau, sodass es zu einer intrazellulären Akkumulation von oxLDL kommt. Seit langem ist bekannt, dass die Aufnahme von oxLDL primär über Scavenger-Rezeptoren erfolgt³³. Es gibt eine Vielzahl verschiedener Scavenger-Rezeptoren, die sich strukturell sehr unterscheiden. Die auf den Makrophagen im Rahmen der Schaumzellbildung wichtigen Rezeptoren sind SR-A1, CD36, SR-B1, CD163 und lektin-like ox-LDL Rezeptor (LOX-1)³⁴⁻³⁶, wobei die quantitativ bedeutendste Rolle dem CD36 Rezeptor zukommt³⁷. Diese Rezeptoren sind auf M2 Makrophagen deutlich stärker exprimiert, als auf M1 Makrophagen, was sich auch in der Funktion der Makrophagen widerspiegelt. Scavenger-Rezeptoren sind nicht nur in der Lage, modifiziertes LDL aufzunehmen, sondern je nach Typ auch Kollagene, Phospholipide und apoptotische Zellen bzw. deren Bestandteile³⁶. Diese erhöhte Dichte an Scavenger-Rezeptoren führt funktionell dazu, dass vor allem M2 Makrophagen an der Entfernung früh-apoptotischer Zellen mitwirken³⁸. Somit nehmen M2 Makrophagen aber auch mehr oxLDL auf, sodass es zu einer gesteigerten Entstehung von Schaumzellen kommt³⁹. Werden die M2 Makrophagen jedoch mit oxLDL überladen, sodass sich Schaumzellen bilden, so machen diese einen Wandel zu einem mehr entzündungsfördernden Phänotyp durch.

Experimente haben gezeigt, dass eine Überlastung des endoplasmatischen Retikulums bei der Aktivierung des alternativen Wegs entsteht. Wirkt man dieser Überlastung entgegen, kommt es einerseits zu einer geringeren Entstehung von M2 Makrophagen, andererseits auch zu einem Übergang bestehender M2 zu M1

1. Einleitung

Makrophagen, was insgesamt eine deutliche Reduktion der Entstehung von Schaumzellen bewirkt hat ⁴⁰.

Doch auch auf M1 Makrophagen haben Scavenger-Rezeptoren spezifische Wirkungen. Der Scavenger-Rezeptor CD36 tritt unter anderem mit Toll-like-Rezeptoren in Wechselwirkung, woraufhin eine erhöhte Produktion und Ausschüttung entzündungsfördernder Zytokine erfolgt ⁴¹.

Insgesamt zeigen Scavenger-Rezeptoren demnach sowohl die Entwicklung von Atherosklerose begünstigende, als auch reduzierende Wirkungen. Während auf der einen Seite beispielsweise CD36 steht, bei dem in Mausversuchen festgestellt wurde, dass bei CD36^{-/-} Mäusen eine deutliche Reduktion in der Ausbildung atherosklerotischer Läsionen zu beobachten war ⁴², legen auf der anderen Seite Experimente zur Untersuchung des Scavenger Rezeptor B1 nahe, dass er bei Expression eine antiatherogene Funktion übernimmt ⁴³.

Auch eine nicht von Scavenger-Rezeptoren abhängige Aufnahme von LDL durch Makrophagen ist bekannt. Aktivierte Makrophagen schütten die Phospholipase A2 aus, die wiederum LDL so spaltet, dass es vereinfacht in das Innere der Makrophagen gelangt und akkumuliert ³⁵.

Doch nicht nur die Aufnahme, sondern auch die Abgabe von Fetten spielt eine wichtige Rolle in der Schaumzellentstehung. Indirekt wird diese unter anderem durch Sphingomyelin reguliert, das von Makrophagen während der Inflammation exprimiert wird. Sphingomyelin führt jedoch zu einem geringeren Ausfluss von Cholesterin und demzufolge zu einer erhöhten intrazellulären Anreicherung ⁴⁴. Die aktive Abgabe von Cholesterin erfolgt über die ATP-binding cassette receptors ABCA1 und ABCG1, die durch HDL hochreguliert werden. Das freigewordene Cholesterin wird dann wiederum durch HDL und andere Proteine aufgefangen und abtransportiert ⁴⁵.

Ein weiteres Zytokin, das direkt an der Differenzierung und Entwicklung der Schaumzellbildung beteiligt ist, ist der macrophage migration inhibitory factor (MIF). Exprimiert wird er von verschiedenen Leukozyten wie T-Zellen und Makrophagen, aber auch von glatten Muskelzellen und Endothelzellen ⁴⁶, wobei oxLDL diese Expression beeinflusst. MIF zeigt eine entzündungsfördernde Wirkung, indem es die Ausschüttung von anderen Zytokinen wie beispielsweise TNF, IL1 und IL6 erhöht ⁴⁷⁻⁴⁸. Auch aufgrund dieser Wirkung wurde eine Beteiligung von MIF an der Entstehung von diversen Krankheitsbildern beschrieben, zu denen autoimmune und entzündliche Erkrankungen wie Sepsis, aber auch Atherosklerose gehören ⁴⁹. Im Rahmen der

1. Einleitung

Atherosklerose sind erhöhte MIF-Werte mit einem höheren Risiko einer Plaqueruptur assoziiert ⁴⁸. Im Mausversuch zeigte sich zudem eine signifikante Reduktion der Entstehung fortgeschrittener Läsionen in MIF^{-/-} Mäusen ⁵⁰, sowie eine geringere Anzahl an Makrophagen und Schaumzellen in atheromatösen Plaques ⁵¹. So senkt MIF die Konzentration an p53, das proapoptotisch wirkt, wodurch es zu einem verlängerten Überleben der Makrophagen kommt und vermutlich demzufolge zu einem gesteigerten Übergang zu Schaumzellen ⁵². Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Effekten reguliert MIF auch die Chemotaxis, da es einerseits auf Endothelzellen die VCAM-Expression steigert, durch Bindung an die CXCR-2 und CXCR-4 Rezeptoren aber auch auf den Leukozyten direkt die Integrinproduktion erhöht ⁵³. MIF ist demnach auf verschiedenen Ebenen unmittelbar an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt und bezogen auf die Funktion von Makrophagen eines der zentralen Zytokine.

1. Einleitung

1.3 Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)

Bone morphogenetic proteins (BMPs) wurden erstmalig in den 1960er Jahren beschrieben⁵⁴. Sie zählen zur transforming growth factor (TGF)- β Familie und sind an diversen Zellprozessen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt. Dabei spielen sie vor allem eine Rolle bei der embryonalen Entwicklung von Organen wie Lunge, Niere, Herz, Nervensystem und den Gonaden⁵⁵⁻⁵⁸. Die BMPs werden in 4 verschiedene Gruppen eingeteilt, die sich aufgrund der Aminosäuresequenzen ergeben. BMP2 und BMP4 gehören zur ersten Gruppe, BMP5, BMP6, BMP7 und BMP8 bilden die zweite Gruppe, BMP12, BMP13 und BMP14 (oder auch growth and differentiation factor (GDF)-5,6 und 7) wiederum die dritte Gruppe und in der letzten Gruppe befinden sich BMP9/10⁵⁹⁻⁶⁰.

BMPs sind Proteine, die in der reifen Form als Dimere vorkommen. Dies können sowohl Homodimere, als auch Heterodimere sein⁶¹⁻⁶². Initial werden sie als große Proteine synthetisiert, die sich aus einer Signalregion, einer Pro-Domäne und dem reifen Protein zusammensetzen. Die reifen Proteine bestehen letztendlich noch aus einer Sequenz von etwa 120 Aminosäuren.

Insgesamt besitzen die Proteine 7 Cystein-Reste, von denen sich 3 jeweils paarig zusammenlagern und den „Cysteine-Knot“ bilden, der übrig gebliebene Cystein-Rest geht eine Bindung mit einem Cystein eines anderen BMPs ein, wodurch es zur Dimer-Bildung kommt⁶³. Die ausgereiften Dimere enthalten keine Signalregion und Pro-Domäne mehr, da die Signalregion schon früh abgespalten wird und die Pro-Domäne vor Sekretion durch proteolytische Spaltung an der charakteristischen Arg-x-x-Arg Sequenz vom reifen Protein getrennt wird⁶¹.

Die Wirkungen der BMPs sind vielfältig und unterscheiden sich auch untereinander teils erheblich. In der Entwicklung tragen sie zur Ausrichtung der Körperachsen bei⁶⁴, wie auch zur Links-Rechts-Asymmetrie unpaariger Organe⁶⁵. In defizienten Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass ein Fehlen von BMP2 oder BMP4 in der Embryonalphase nicht überlebensfähig ist, während ein Mangel an BMP7 erst nach der Geburt zum Tod führt⁶⁶.

Ihren Namen verdanken sie dem Umstand, dass bei ihrer Erstbeschreibung eine durch sie hervorgerufene Zunahme von Knochenwachstum festgestellt wurde. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass BMPs eine Erhöhung der Osteoblastenzahl

1. Einleitung

durch vermehrte Differenzierung erwirken⁶⁷. Erst im Nachhinein stellte sich heraus, dass ihre Funktion keinesfalls auf das Knochengewebe beschränkt ist. Daher gibt es Bestrebungen, den Namen zu body morphogenetic proteins zu ändern, um den komplexen Wirkungen der BMPs gerecht zu werden⁶⁸. Auch im Rahmen der epithelial-mesenchymalen Transition, die eine Rolle bei der Entstehung fibrotischer Erkrankungen spielt, wurden erhöhte Konzentrationen einzelner BMPs festgestellt. Dabei zeigten sich sowohl pro-, als auch antifibrotische Effekte verschiedener BMPs⁶⁹.

Die Kenntnis über den Einfluss von BMPs auf die Genese der Atherosklerose ist in den letzten Jahren gewachsen. Vor allem BMP 2 und BMP4 werden in betroffenen Gebieten verstärkt exprimiert und eine entzündungsfördernde Wirkung im Rahmen der Atherosklerose ist bekannt⁷⁰⁻⁷¹. Eine Inhibition der BMP Wirkung im Mausmodell durch LDN-193189 führte zu einer geringeren Ausprägung einer Entzündungsreaktion der Gefäßwand und somit auch zur Reduktion der Entwicklung von Atherosklerose. Zudem war ein Absinken der Plasmaspiegel von Cholesterin und LDL zu beobachten⁷².

Die BMPs wie auch andere Mitglieder der TGF- β Superfamilie binden über 2 verschiedene Rezeptoren an die Zelloberfläche (s.a. Abbildung 2). Diese werden als sogenannte Typ I und Typ II Rezeptoren bezeichnet, die für eine erfolgreiche Weiterleitung des Signals beide erforderlich sind⁷³⁻⁷⁴. Es handelt sich dabei um Serin/Threonin Kinasen, wobei die Kinase des Typ II-Rezeptors den Typ I Rezeptor phosphoryliert⁷⁵, woraufhin intrazellulär vorhandene Smad-Proteine phosphoryliert werden⁷⁶. Die Typ I Rezeptoren untergliedern sich nochmals in 3 Gruppen, die BMPR-I Gruppe, die BMPR-IA (=ALK 3) und BMPR-IB (=ALK 6) umfasst, die ALK (activin receptor-like kinase) -1 Gruppe (ALK 1 und 2) und die T β R-Gruppe. Zudem lassen sich 3 verschiedene Typ II Rezeptoren unterscheiden (BMPR-II, ActR II und ActR IIb). Während BMP2 und BMP4, die derselben Untergruppe der BMPs angehören und sich in ihrer Struktur sehr ähneln, bevorzugt an die Typ I Rezeptoren BMPR-IA und BMPR-IB binden⁷⁷, haben die BMPs der Gruppe um BMP5, BMP6, BMP7, BMP8 eine höhere Affinität zu Typ II Rezeptoren⁷⁸. Die Affinität der letztgenannten Gruppe zu Typ I Rezeptoren wird jedoch durch das Vorhandensein von Typ II Rezeptoren gesteigert.

Die durch Phosphorylierung aktivierten Smad-Proteine (1,5,8) zählen zur Gruppe der receptor-regulated-Smads und entfalten ihre Wirkung über die Transkription

1. Einleitung

spezifischer Gene im Zellkern ⁷⁹⁻⁸⁰. Es gibt daneben noch andere Arten von Smad-Proteinen, nämlich die common-partner-Smads, und die inhibitory Smads ⁸¹. Smad 4 wirkt als Korezeptor der receptor-regulated-Smads an der Transkription mit.

Zusätzlich zur direkten Interaktion der Typ I/II Rezeptoren mit den Smad-Proteinen werden diese Proteine zum einen auch indirekt über andere Signalkaskaden wie z.B. Erk und JNK aktiviert, zum anderen erfolgt auch eine Weiterleitung des BMP-Signals komplett unabhängig von Smad-Proteinen. Hierbei spielen vor allem MAP-Kinasen eine entscheidende Rolle, für die eine erfolgreiche Signaltransduktion durch TGF- β Mitglieder bei Smad-defizienten Mäusen gezeigt werden konnte ⁸²⁻⁸³.

Um eine uneingeschränkte Wirkung der BMPs zu vermeiden, besitzt der Körper auch Mittel, diese Signaltransduktion abzuschwächen bzw. aufzuheben. Dazu zählen die bereits erwähnten inhibitorischen Smad-Proteine (Smad 6 und 7), die einerseits ebenfalls an den Typ-I Rezeptor binden können und damit eine Interaktion der receptor-regulated-smads mit diesem verhindern, andererseits aber auch direkte Bindungen mit Smad 1 eingehen können. Dadurch kann der Co-Rezeptor Smad 4 nicht mehr binden, der für die Komplexbildung zur Transkription erforderlich ist ⁸⁴⁻⁸⁶. Weiterhin wurde ein Rezeptor namens BAMBI (BMP and activin membrane-bound inhibitor) entdeckt, an den extrazellulär BMPs und andere Mitglieder der TGF β Familie binden, der jedoch intrazellulär keine Serin/Threonin Kinase wie die Typ I/II Rezeptoren besitzt und deswegen keine Weiterleitung des Signals erfolgt. Die Expression dieses inhibitorischen Rezeptors ist an die von BMP4 gebunden ⁸⁷⁻⁸⁸.

1. Einleitung

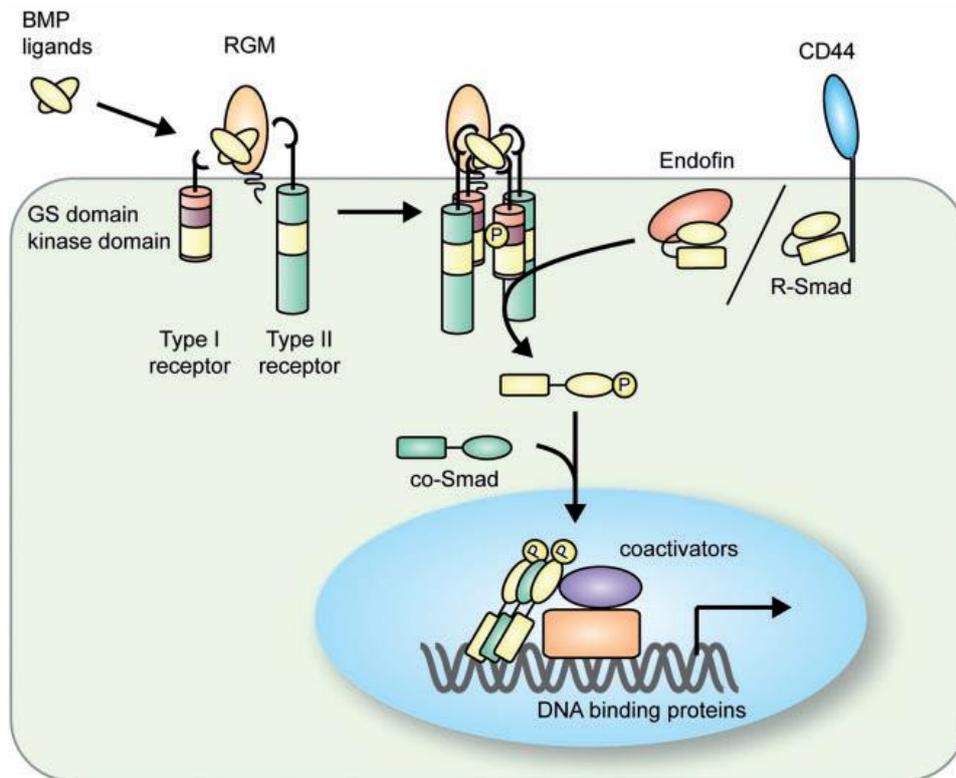


Abbildung 2: Funktionsweise der Signaltransduktion von der extrazellulären Bindung von BMP bis zur Transkription von Genen im Zellkern⁵⁹: BMP bindet je nach Typ an verschiedene Typ I und Typ II Rezeptoren, die membranständig auf Zellen vorhanden sind. Nach Zusammenlagerung der Rezeptoren zu Tetramer-Komplexen werden durch mehrfache Phosphorylierung Smad-Proteine aktiviert, die daraufhin mithilfe von Ko-Aktivatoren die Transkription im Zellkern regulieren.

1. Einleitung

1.4 Interaktionen der BMPs mit anderen Proteinen

Die Wirkungen der BMPs werden nicht nur intrazellulär reguliert, sondern auch durch extrazelluläre Interaktionen mit diversen Proteinen ⁸⁹. Es wurde inzwischen eine beträchtliche Zahl an Antagonisten der BMPs identifiziert, die eine Bindung mit den BMPs eingehen und somit eine erfolgreiche Interaktion mit den Rezeptoren verhindern ⁹⁰.

Zu diesen Antagonisten gehören Chordin, Noggin, Twisted gastrulation, Crossveinless 2 und die Proteine der CAN (Cerberus and DAN) -Familie ⁹¹, sowie Follistatin ⁹². Diese DAN-Familie setzt sich unter anderem aus den Proteinen Cerberus, DAN, Gremlin, PRDC, Sclerostin, USAG-1 und Coco zusammen ^{91, 93}. Wie auch die BMPs und alle weiteren Mitglieder der TGF- β -Familie besitzen diese Antagonisten einen sogenannten „Cystine-Knot“, welcher von mindestens 6 gepaarten Cystein-Resten gebildet wird und somit die charakteristische Knoten-Struktur formt ⁹⁴.

Die Antagonisten der BMPs spielen bei diversen pathologischen Vorgängen in unterschiedlichen Geweben eine Rolle. Dabei können sowohl Unterfunktionen der BMP-Antagonisten und folglich eine verstärkte Aktivität der BMPs, als auch Überfunktionen zu einem Ungleichgewicht führen, das sich im Körper durch Dysfunktionen manifestiert.

In Mausmodellen wurde beispielsweise festgestellt, dass eine verstärkte Aktivität von Noggin zu Osteoporose der Mäuse geführt hat ⁹⁵. Die Höhe der Noggin Expression wiederum wird durch die BMPs reguliert, wobei erhöhte BMP-Werte auch mit einer erhöhten Noggin-Expression einhergehen ⁹⁶. Dies deutet darauf hin, dass einer hohen Expression von BMPs durch eine erhöhte Expression von Noggin entgegengewirkt wird.

Auch an der Entstehung von Fibrosen und an der Tumor- und Angiogenese sind BMPs und ihre Antagonisten entscheidend beteiligt ⁹⁷⁻⁹⁹.

Gerade bei der Pathogenese von Organ-Fibrosen wurden einem Vertreter der CAN-Familie, nämlich Gremlin-1, wichtige Funktionen nachgewiesen. Dabei war sowohl bei fibrotischen Lungenerkrankungen wie der idiopathischen, pulmonalen Fibrose ¹⁰⁰, bei der Leberfibrose ⁹⁷ und bei interstitiell-fibrotischen Erkrankungen der Nieren ¹⁰¹⁻¹⁰² die Expression von Gremlin-1 gesteigert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass bei spezifischen Varianten des Gremlin-1 Gens eine erhöhte Neigung zur

1. Einleitung

Entwicklung eines fibrotischen Umbaus in Organen bzw. in der Folge zu einer verstärkten Ausprägung dieser Fibrose vorliegt ¹⁰³⁻¹⁰⁴.

Gremlin-1 entfaltet seine Wirkungen jedoch nicht nur an adulten Zellen, sondern ebenso in der embryonalen Entwicklung, die durch die BMPs vielfältig reguliert wird.

So ist Gremlin-1 durch Inhibition der BMPs an der Entwicklung von Organen wie Lungen und Nieren und von Knochen, Muskeln und Gelenken beteiligt ^{101, 105}. Bei

Gremlin-1 defizienten Mäusen wurde nachgewiesen, dass es zu einer fehlerhaften bzw. ausbleibenden Entwicklung von Fingern und zu einem Zusammenschluss von

Radius und Ulna kommt ¹⁰⁶. Weiterhin zeigte sich in einem anderen Experiment, dass es bei Mäusen ohne Expression von Gremlin-1 zwar zur Entwicklung eines

funktionsfähigen Herzens kam, dass Gremlin-1 aber dennoch in *in vitro*

Experimenten in die Genese von Kardiomyozyten involviert ist ¹⁰⁷.

Als Antagonist der BMPs bindet Gremlin-1 an BMP2, BMP4 und BMP7, wobei die jeweilige Affinität unterschiedlich hoch ist. Demnach scheint Gremlin-1 bevorzugt an BMP2, danach an BMP4 und mit der niedrigsten Affinität an BMP7 zu binden ¹⁰⁸.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Gremlin-1 nicht nur Mitglieder der BMP-Familie antagonisiert, sondern auch MIF ¹⁰⁹. Es bewirkt dadurch eine geringere

Monozytendifferenzierung zu Makrophagen und Schaumzellen, verringert die Anzahl von Makrophagen in Plaques und wirkt somit dem Fortschreiten der Atherosklerose entgegen.

Ein weiterer Vertreter der Antagonisten der BMPs, der jedoch nicht zur CAN-Familie gehört, ist das matrix G1a protein (MGP). Die Antagonisierung der Wirkung der

BMPs wird jedoch ebenso durch extrazelluläre Bindung an die jeweiligen BMPs erreicht ¹¹⁰. MGP ist entscheidend daran beteiligt, eine überschießende Aufnahme

von Kalziumphosphat der Endothelzellen und eine damit einhergehende

Kalzifizierung zu verhindern ¹¹¹. Zusätzlich schwächt es auch entzündliche Vorgänge in atheromatösen Regionen ab ⁷⁰.

1. Einleitung

1.5 BMP2

Das Gen für das bone morphogenetic protein-2 liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 20 (20p12) ⁶⁰. BMP2 und BMP4, die zu der selben BMP-Unterfamilie gehören, zeigen eine Übereinstimmung von etwa 80% in ihrer Aminosäuresequenz ⁶¹. BMP2 spielt eine wichtige Rolle bei der enchondralen Ossifizierung, was in knock-out Mäusen bewiesen wurde, bei denen ein Fehlen von BMP2 zu verschiedenen Pathologien in der Regulation des Knorpelstoffwechsels geführt hat ¹¹². Auch für die Einleitung der Heilung eines Knochenbruchs wird BMP2 benötigt ¹¹³ (s. Abbildung 3). Dies hat dazu geführt, dass rekombinant hergestelltes BMP2 inzwischen auch therapeutisch eingesetzt wird. Studien haben gezeigt, dass nach hochgradigen, offenen Tibiaschaftfrakturen zusätzlich zur standardmäßigen Versorgung eingesetztes BMP2 die Rate an Zweiteingriffen gesenkt und die Wund- und Knochenheilung gesteigert hat ¹¹⁴⁻¹¹⁵.

Ebenso ist BMP2 für die physiologische Entwicklung des Herzens unentbehrlich. Es führt zu einer regelhaften Ausprägung des Endokards. Dadurch kommt es im Verlauf zur Entstehung von Klappen und Septen, sodass sich ein vierkammeriges Herz ausbilden kann, wie es höhere Wirbeltiere ausbilden ⁶⁶.

Es wurde eine Expression von BMP2 in atherosklerotischen Plaques beschrieben ¹¹⁶. In *in vitro* Versuchen konnte gezeigt werden, dass BMP2 die Phosphataufnahme in glatten Muskelzellen der Gefäßwand steigert, die als wichtiger Faktor bei der Kalzifizierung arterieller Gefäßwände angesehen wird. Zudem fördert BMP2 die Differenzierung von glatten Muskelzellen in einen osteogenen Phänotyp ^{67, 117}. Dabei spielt BMP2 nicht nur eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung der glatten Muskelzellen, sondern ist auch dafür verantwortlich, dass diese aus der Media in die Intima einwandern. Dies scheint neuen Studien zufolge durch eine Aktivierung von Myosin Va ausgelöst zu werden, wobei die genauen Mechanismen noch unklar sind ¹¹⁸. Zudem wirkt BMP2 über eine Aktivierung des BMPRII zusammen mit BMP4 chemotaktisch und führt folglich zu einer Mobilisation von Monozyten ¹¹⁹.

1. Einleitung

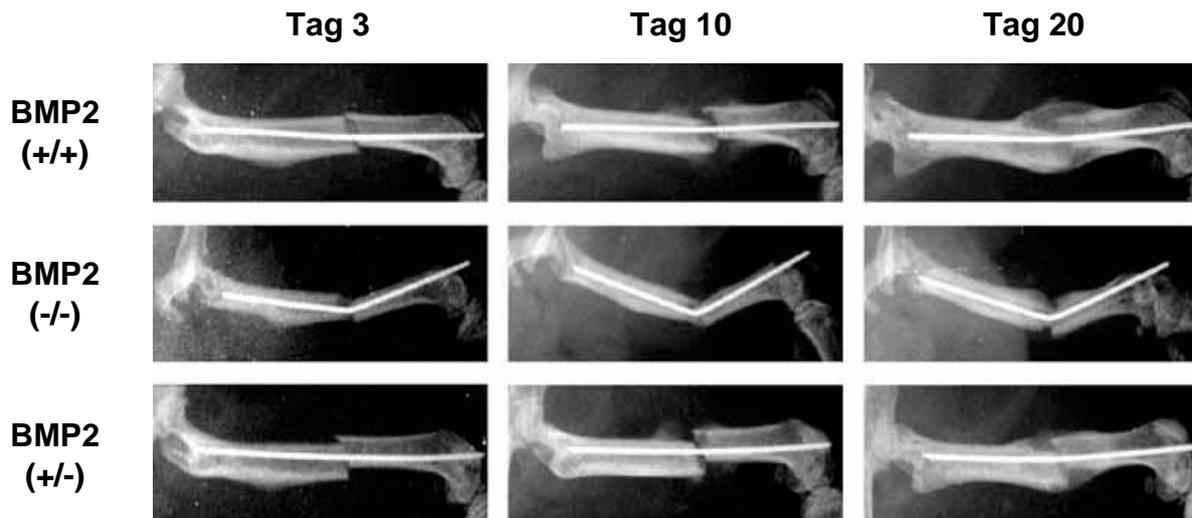


Abbildung 3: Ausbleiben der Frakturheilung ohne BMP2 leicht modifiziert nach 113:

Dargestellt sind Röntgen-Bilder an Tag 3, 10 und 20 nach Fraktur des Femurs von Mäusen. In der ersten Zeile erkennt man bei der Kontrollmaus mit normaler BMP2 Menge eine ausgeprägte Kallusbildung und Frakturheilung. Bei der BMP2 defizienten Maus in der zweiten Zeile ist keine Frakturheilung erkennbar, wohingegen bei der Maus mit halber BMP2 Menge eine verlangsamte, aber voranschreitende Heilung zu sehen ist

1.6 BMP4

Das Gen für BMP4, dem strukturell nächsten Verwandten von BMP2, liegt auf Chromosom 14 (14q22-23)⁶⁰. Wie auch die anderen BMPs ist BMP4 für die korrekte Ausbildung verschiedener Organe und Organ-Systeme erforderlich. So wurde in Tierversuchen nachgewiesen, dass eine fehlende BMP4-Wirkung in der Embryogenese zu einem Ausbleiben der Entwicklung von Mesoderm und dem damit einhergehenden Tod führt¹²⁰. In der Entwicklung des Auges ist BMP4 ein Initiator in der Entstehung der Linse, ohne den es im Tierversuch nicht zu einer Linseninduktion kam¹²¹. Eine erhöhte Konzentration von BMP4 wurde in Zellen von Patienten mit Barrett-Ösophagus festgestellt. Aufgrund durchgeführter *in vitro* Versuche vermutet man, dass BMP4 einen Übergang des Epithels von Plattenepithel zu Zylinderepithel unterstützt¹²².

Auch an der Pathogenese des Kolonkarzinoms ist BMP4 beteiligt. Dabei ist zum einen die Expression von BMP4 besonders in der Übergangszeit von Adenom zu Karzinom in den befallenen Zellen gegenüber gesunden Mukosazellen erhöht, zum anderen zeigten sich auch Effekte auf adulte Tumorzellen. Hierbei verhinderte BMP4 einen Zelluntergang durch Apoptose und veränderte zudem den Phänotyp dieser

1. Einleitung

Zellen dahingehend, dass invasive Fähigkeiten gestärkt wurden ¹²³. Im Unterschied dazu wurden bei speziellen Zellen pulmonaler Adenokarzinome (A549) gegensätzliche Effekte von BMP4 beschrieben. Durch kontinuierliche Behandlung mit BMP4 konnte das Zellwachstum verringert werden und die Tumorzellen zeigten vermehrt Zeichen von Zellalterung. Außerdem wurde in *in vitro* Matrix Assays eine schwächere Invasion der mit BMP4 behandelten Zellen gegenüber der Kontrollgruppe nachgewiesen ¹²⁴. Es scheint demnach so, dass BMP4 abhängig vom Ort, an dem es seine Wirkung entfaltet, das Tumorstadium sowohl verstärkend als auch abschwächend regulieren kann.

An Stellen, an denen es in Arterien zu turbulenten Blutströmen aufgrund von Abzweigungen kommt und eine erhöhte Gefahr für die Ausbildung endothelialer Dysfunktionen besteht, konnte eine erhöhte Expression von BMP4 durch Endothelzellen nachgewiesen werden. Außerdem wurde eine vermehrte BMP4-Expression auf Endothelzellen, die als Teil der fibrösen Kappe bei atheromatösen Plaques über Schaumzellformationen lagen, beschrieben, während bei gesunden Zellen dieser Art eine solche Expression nicht zu finden war ¹²⁵. Die erhöhte Konzentration von BMP4 induzierte daraufhin zum einen die nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase (NADPH Oxidase), die wiederum reactive oxygen species (ROS) ausbildet, zum anderen aber auch die Expression von intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) und COX-2 ¹²⁶⁻¹²⁷. Alle diese Vorgänge tragen dazu bei, dass die Adhäsion von Monozyten und somit eine inflammatorische Reaktion gesteigert wird, was zu einer Progression der Atherosklerose führt ¹²⁸.

1. Einleitung

1.7 BMP7

BMP7 gehört zu einer anderen Untergruppe der BMPs als BMP2 und 4 und wird auch osteogenic-protein 1 genannt. Es weist strukturell eine größere Ähnlichkeit mit BMP5, BMP6 und BMP8 auf. Kodiert wird es auf dem gleichen Chromosom wie BMP2, allerdings auf dem langen Arm (20q13)⁶⁰. Im Gegensatz zu BMP2 und 4 ist es verstärkt an der Regulation von Prozessen im Urogenitalsystem beteiligt. So spielt BMP7 eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Nieren, da in Mausversuchen ein Fehlen von BMP7 zu ausgeprägten Fehlbildungen und Entwicklungsstörungen geführt hat¹²⁹. Hierbei scheint vor allem der Effekt wichtig zu sein, dass BMP7 zum einen eine Apoptose der noch undifferenzierten mesenchymalen Nierenzellen verhindert, zum anderen aber auch eine verfrühte Differenzierung dieser Zellen unterbindet¹³⁰. Wie BMP4 ist auch BMP7 für diverse Prozesse in der Entwicklung des Auges, vor allem der Linse, erforderlich¹³¹.

In der erwachsenen Niere hemmt BMP7 die Ausbildung einer Fibrosierung. Es wirkt hier als Antagonist von TGF β 1 einer epithelialen-mesenchymalen Transition entgegen¹³². Im Rahmen der Fibrosierung von Ureterstenosen wurde eine verstärkte Akkumulation von M2 Makrophagen gegenüber M1 Makrophagen beobachtet, woraufhin durch verstärkte TGF β 1 Produktion die bekannte, antifibrotische BMP7 Wirkung aufgehoben wurde. In einem anderen Experiment wiederum führte die BMP7-Gabe zu THP-1 Zellen in einer Kultur zu einer verstärkten Differenzierung zu M2-Makrophagen und einer damit einhergehenden Reduzierung der inflammatorischen Reaktion¹³³. In dieser und in weiteren Studien zeigte sich, dass es unter BMP7 Einfluss zu einer Reduktion der Expression von MCP-1 kommt, das chemotaktisch auf Monozyten/Makrophagen wirkt und eine Entzündungsreaktion einleiten kann¹³⁴. Außerdem verhinderte BMP7 eine Differenzierung glatter Muskelzellen in der Gefäßwand zu einem knochenähnlichen Phänotyp, einem Vorgang, der entscheidend an der Kalzifizierung arterieller Gefäßwände beteiligt ist¹³⁵. Es zeigte sich jedoch auch, dass Monozyten und Makrophagen durch Interaktion mit BMP7 erhöhte Werte an tissue factor (TF) exprimierten. Da eine Expression von tissue factor an Stellen, an denen eine Interaktion mit Thrombozyten wahrscheinlich ist, zur Entstehung von Thromben maßgeblich beiträgt, wird dieses Risiko durch BMP7 indirekt erhöht¹³⁶.

1. Einleitung

In Knochenmetastasen von Prostatakarzinomen führte BMP7 zu einer Alterung und Größenreduktion von Tumorstammzellen und somit zu einer Verringerung der Größenprogression ¹³⁷.

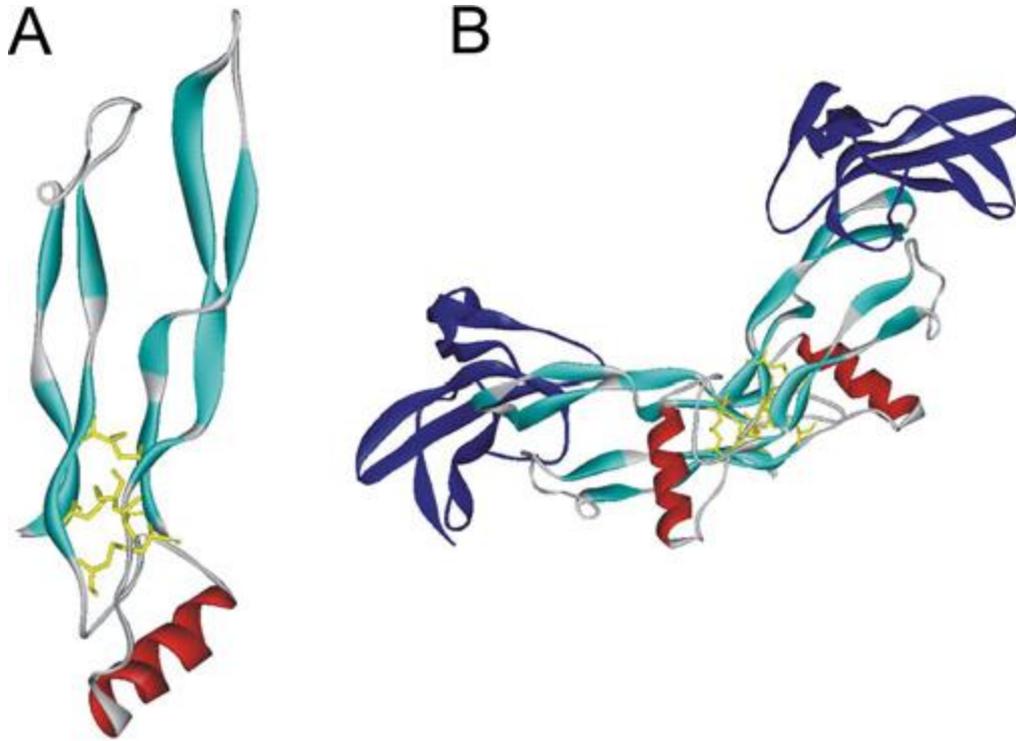


Abbildung 4: strukturelle Darstellung eines BMP7 Monomers (A) und eines BMP7 Dimers, gebunden an 2 Typ II Rezeptoren (B) ⁹²: In der Abbildung des Monomers (A) sind gelb die 3 Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten zu erkennen. In der zweiten Abbildung (B) erkennt man, dass sich eine weitere Disulfidbrücke zwischen den beiden Monomeren gebildet hat. Die beiden Monomere lagern sich so aneinander an, dass die Regionen, die mit dem Typ II Rezeptor interagieren, in entgegengesetzte Richtungen zeigen.

1. Einleitung

1.8 Fragestellung

Dass die bone morphogenetic proteins Effekte auf zahlreiche Zell- und Gewebearten und auf deren Regulierung haben, ist bekannt. Auch im Rahmen von atherosklerotischen Läsionen wurden erhöhte Expressionen von BMPs entdeckt, die Wirkung auf Monozyten ist jedoch bisher nur wenig erforscht.

Daher soll in dieser Arbeit der Fragestellung nachgegangen werden, inwiefern BMPs eine Auswirkung auf *in vitro* kultivierte humane Monozyten in Bezug auf ihre Differenzierung zu Makrophagen und Schaumzellen haben. Dabei dienen als Kontrolle und Referenz die Zytokine MIF und Gremlin-1, deren Wirkung auf die Schaumzellentstehung bereits genauer beschrieben ist. Von MIF ist bekannt, dass es sich fördernd auf die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen und Schaumzellen auswirkt und unter anderem dadurch zur Entstehung und zur Progression von Atherosklerose beiträgt. Gremlin-1 hingegen wirkt als Antagonist von MIF diesen Effekten entgegen und hat somit auf die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen eine hemmende Wirkung. Da Gremlin-1 aber nicht nur ein Antagonist von MIF, sondern auch der BMPs ist, wird ebenso untersucht, ob die Kombination von BMPs und Gremlin-1 andere Effekte hervorruft, als die alleinige Gabe der jeweiligen Zytokine.

Abschließend wird getestet, inwiefern sich Unterschiede durch die Gabe von BMPs und Gremlin-1 in der Produktion anderer Zytokine durch Monozyten/Makrophagen und Thrombozyten feststellen lassen.

2. Material und Methoden

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Brutschrank Sanyo CO2 Incubator	Panasonic Healthcare Holdings Co., Ltd., Tokio, Japan
Chemilumineszenzkamera Chemi-Doc™ MP System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Mikroskop Axiovert 200; Videokamera FK-6990-IQ-S	Carl Zeiss Microscopy AG, Jena, Deutschland Pieper GmbH, Schwerte, Deutschland
Mikroskop Diaphot Inverted Tissue Culture Microscope	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Sysmex KX-21N™ Automated Hematology Analyzer	Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland
Vortex IKA MS 3 basic	IKA Werke GmbH & Co KG, Staufen, Deutschland
Wasserbad Lauda Circulating Bath Model M20	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Multifuge 1S	Fischer Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland

2. Material und Methoden

2.1.2 Zellkulturen

Bezeichnung	Hersteller
Blutkultur Adapter Long-Neck	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Eppendorff Safe-lock Tubes 0,5ml, 1,5ml, 2ml	Eppendorff AG, Hamburg, Deutschland
Falcons Centrifuge Tube 15ml, 50ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
FBS	Fischer Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Ficoll-Paque Plus	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Flask Cellstar Cell Culture Flasks	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
PBS	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
RPMI-1640 Medium, Gibco	Fischer Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Safety-Multifly Kanüle	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Spritze Injekt 20ml, Luer Ansatz	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Stabpipette Corning Costar Stripette 5ml, 10ml, 25ml, 50ml	Corning Incorporated, Corning, USA
Sterilfilter Millex HP Syringe Filter-Unit	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Trypanblau Trypan Blue Solution, 0,4%	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin 0,05% EDTA, Gibco	Fischer Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland

2. Material und Methoden

Zählkammer C-Chip Disposable Haemocytometer	NanoEnTek Inc, Seoul, Korea
Zellkulturplatte Corning Costar Cell culture plates, 96 well	Corning Incorporated, Corning, USA

2. Material und Methoden

2.1.3 Puffer und Lösungen

Acid-Citrate-Dextrose-Puffer (ACD)	
Aqua dest.	
D-(+)-Glukose	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Zitronensäure ($C_6H_8O_7$)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Tyrodes 10x	
Aqua dest.	
Kaliumchlorid (KCl)	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tyrodes-Puffer	
Albumin Fraction V (pH 7)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Aqua dest.	
D-(+)-Glukose	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Salzsäure (HCl)	

2. Material und Methoden

2.1.4 Proteine

Protein	Bestellnummer	Hersteller
acLDL	770201-6	Kalen Biomedical LLC, Germantown, USA
BMP2	CYT-080	ProSpec, East Brunswick, USA
BMP4	CYT-081	ProSpec, East Brunswick, USA
BMP7	CYT-276	ProSpec, East Brunswick, USA
Gremlin-1	PRO-1359	ProSpec, East Brunswick, USA
MIF	CYT-596	ProSpec, East Brunswick, USA

2.1.5 Zytokin Array

Art	Bestellnummer	Hersteller
Human Cytokine Array C6	AAH-CYT-6	RayBioTech, Inc, Norcross, USA

2. Material und Methoden

2.1.6 Software

Produkt	Hersteller
Adobe Photoshop	Adobe Systems Software Ireland Limited, Dublin, Republic of Ireland
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc, La Jolla, USA
IBM SPSS Statistics Version 23	IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland
ImageJ Version 1.4.3.67	ImageJ, Wayne Rasband, National Institut of Health, USA
Microsoft Office Excel 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Office PowerPoint 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Office Word 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA

2. Material und Methoden

2.2 Methoden

2.2.1 Anlegen der Zellkulturen

2.2.1.1 Monozyten Isolierung (s.a. Abbildung 8)

Die Monozyten wurden aus Buffy Coats gewonnen, die von Spendern aus der Transfusionsmedizin kamen. Die Isolierung der Monozyten aus diesen erstreckte sich über zwei Tage und erfolgte komplett unter sterilen Bedingungen an einer Sterilbank. Zu Beginn wurde der Inhalt des Buffy Coats in eine Blutkulturflasche gegeben und daraufhin auf ein Volumen von ca. 95ml mit PBS aufgefüllt, wobei auf eine gute Durchmischung zu achten war. Daraufhin wurden drei 50ml Falcons (Rundboden-Röhrchen) mit 20ml Ficoll-Paque-Lösung befüllt, auf welche dann vorsichtig der mit PBS verdünnte Buffy Coat gegeben wurde. Bei richtiger Zugabe des Buffy Coats entstanden so zwei Phasen in dem Falcon, wobei unten die transparente Ficoll-Paque-Lösung und darüber die durch verbliebene Erythrozyten rot-gefärbten Blutbestandteile zu sehen waren. Im Folgenden wurden die Falcons bei 2100 Umdrehungen/Minute für 20 Minuten ohne Bremse zentrifugiert.

Nach Abschluss der Zentrifugation präsentierte sich nun eine rote Schicht am Boden, eine gelblich transparente Schicht oben und dazwischen die leukozytenhaltige Intermediärschicht. Diese Intermediärschicht wurde mit Hilfe einer sterilen Transferpipette abgenommen und in ein neues Röhrchen, in das zuvor einige Milliliter PBS-Lösung gegeben wurden, überführt. Anschließend wurde der Falcon wiederum mit PBS auf 50ml aufgefüllt. Es folgte ein zweiter Zentrifugationsschritt, dieses Mal jedoch bei 1600 Umdrehungen/Minute bei 10 Minuten mit Bremse. Der flüssige Überstand, der nach der Zentrifugation übriggeblieben war, wurde verworfen und die verbleibende weißliche Masse am Boden des Röhrchens („Pellet“) mit PBS Lösung auf 30ml aufgefüllt und resuspendiert. Darauf folgten zwei weitere Zentrifugationsschritte, bei denen jeweils mit 800 Umdrehungen/Minute bei 12 Minuten mit Bremse zentrifugiert wurde, der Überstand verworfen und das Pellet mit PBS-Lösung resuspendiert und auf 30ml aufgefüllt wurde.

Nach der letzten Zentrifugation wurde wiederum der Überstand verworfen, das Pellet dieses Mal jedoch mit 4,5ml RPMI-Medium complete resuspendiert.

2. Material und Methoden

Das RPMI-Medium complete wurde vor Gebrauch mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin versetzt und im Wasserbad erwärmt. Dies gilt auch für alle weiteren Anwendungen des RPMI-Mediums in diesem und den folgenden Versuchen.

Der Inhalt des Falcons wurde auf 3 Blutkulturflaschen verteilt, in die vorab schon 15ml des RPMI-Mediums complete gegeben wurden. Die Blutkulturflaschen wurden vorsichtig geschwenkt, um eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Zellen zu erreichen, und daraufhin über Nacht in den Brutschrank gelegt, um dort zu inkubieren.

Am nächsten Tag wurde das Medium aufgesogen und der Boden der Kulturflasche mit diesem Medium ca. 3-4x gespült, um nicht haftende Zellen abzuwaschen. Dieses Prozedere wurde mit 15ml PBS wiederholt, bis das aufgesogene PBS nicht mehr trübe, sondern transparent erschien.

Um die nun noch haftenden Monozyten vom Boden der Flasche zu lösen, wurde Trypsin (3-4ml) hinzugegeben, die Flasche geschwenkt und für 5-10 Minuten nochmals in den Brutschrank gelegt. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Flaschen unter dem Mikroskop betrachtet, um herauszufinden, ob die Zellen nun beweglich waren oder nicht. Die Trypsin Reaktion wurde daraufhin mit 15ml RPMI-Medium complete gestoppt und der Inhalt der Flasche in ein Falcon überführt. Dieses Prozedere wurde so lange wiederholt, bis sich unter mikroskopischer Ansicht nur noch sehr wenige Monozyten erkennen ließen.

Hiernach folgte eine letzte Zentrifugation (1600 Umdrehungen/Minute, 10 Minuten mit Bremse). Das nun verbleibende Pellet wurde mit wenig RPMI-Medium complete resuspendiert und in ein Eppendorf-Cup überführt. Um die Konzentration der Monozyten in diesem Eppendorf-Cup zu bestimmen wurden 2x 10 μ l entnommen und in zwei neue Cups pipettiert. In eines dieser Gefäße wurde daraufhin 90 μ l PBS gegeben, in das andere 80 μ l PBS und 10 μ l Trypanblau. Das erste Gefäß wurde durch den Sysmex KX-21N™ Automated Hematology Analyzer ausgewertet, aus dem zweiten wurden nach sorgfältiger Durchmischung 10 μ l entnommen und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben, die daraufhin lichtmikroskopisch ausgewertet wurde. Aus dem Vergleich dieser beider Werte ließ sich die Konzentration an Monozyten relativ genau bestimmen.

2. Material und Methoden

2.2.1.2 Anlegen der Monokulturen

In dem ersten Versuchsaufbau wurden Monozyten-Monokulturen angelegt. Dafür wurden 96-well plates verwendet, die pro well mit 100000 Monozyten in 100µl RPMI-Medium complete befüllt wurden. Anschließend wurde die Zellkulturplatte in den Brutschrank gelegt.

Am 5. Tag nach Anlage der Kultur (die Gabe der Monozyten in Medium in die Zellkulturplatte entspricht Tag 1) wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, indem der Überstand vorsichtig abpipettiert wurde und die gleiche Menge an frischem Medium zugegeben wurde. Zusätzlich wurde acLDL (80µg/ml) in jede Kammer gegeben sowie die verschiedenen Proteine (BMP2, BMP4, BMP7, Gremlin-1 und MIF) in die entsprechenden Kammern. Für jeden unterschiedlichen Versuchsansatz wurden 3 wells befüllt.

Dabei war die Konzentration der Proteine in der Zellkulturkammer von Grem1, BMP2, BMP4 und BMP7 jeweils 1µg/ml, die von MIF hingegen 10ng/ml.

Am 10. Tag nach Anlage wurden die gleichen Mengen an Proteinen nochmals hinzugegeben, ein erneuter Mediumwechsel fand jedoch nicht statt.

Zur Auswertung der Zellkulturen wurden diese an den Tagen 8, 11 und 14 unter einem Lichtmikroskop betrachtet, anschließend je 3-5 Bilder pro Ansatz in 10facher, 20facher und 40facher Vergrößerung erstellt und im Folgenden am Computer mit Hilfe des Programmes ImageJ ausgewertet.

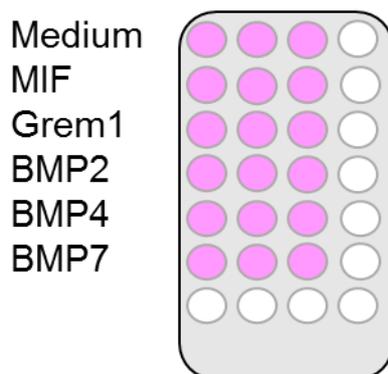


Abbildung 5: Anordnung der verschiedenen Ansätze in den einzelnen Wells der Zellkulturplatten

2. Material und Methoden

2.2.1.3 Anlegen der Monozyten-Thrombozyten-Kokulturen

Monozyten Isolierung

Die Isolierung der Monozyten erfolgte hier in gleicher Weise wie die bei der Monozyten-Monokultur.

Thrombozyten Isolierung (s.a. Abbildung 8)

Die Thrombozyten für die Kokulturen wurden aus Vollblut gesunder, freiwilliger Spender aus dem Labor gewonnen. Zur Vorbereitung wurde ACD-Puffer steril hergestellt bzw. vorhandener Puffer sterilfiltriert. Der Puffer setzt sich zusammen aus 12,5g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat, 6,82g Zitronensäure und 10g Glukose, die in 500ml destilliertem Wasser gelöst werden und anschließend durch Titration mit NaOH ein pH-Wert von 4,69 eingestellt wird.

4ml dieses Puffers wurden daraufhin in 20ml Spritzen überführt. Die Blutentnahme erfolgte durch den Einsatz des Butterfly-Blutentnahmesystems, auf dessen Ende per Adapter die vorbereiteten Spritzen mit dem ACD-Puffer aufgesetzt werden konnten. Es war darauf zu achten, dass das Blut sehr langsam und vorsichtig bei nicht zu eng gezogenem Stauschlauch abgenommen wurde, da so das Risiko einer vorzeitigen Aktivierung der Thrombozyten verringert wurde. Sobald die Spritze vollständig befüllt war, wurde sie leicht geschwenkt, um eine Durchmischung des Blutes mit dem Puffer zu erreichen.

Der Inhalt der 20ml Spritzen wurde anschließend auf 15ml Falcons verteilt (je 10ml/Falcon), wobei auch hier wiederum Wert auf einen möglichst langsamen, aber konstanten Blutfluss zu legen war. Im Folgenden wurden die Falcons bei 1000 Umdrehungen/Minute für 20 Minuten ohne Bremse zentrifugiert.

Während der Zentrifugation war Zeit, den danach benötigten Tyrodes Puffer herzustellen. Dafür wurden 20ml Tyrodes 10x mit 0,2g Glucose und 0,2g Albumin vermischt, mit destilliertem Wasser auf 200ml aufgefüllt und unter ständig rotierendem Magnetrührer auf einen pH-Wert von 6,5 durch Zugabe von 1M HCl titriert. 10x Tyrodes besteht aus 80g NaCl, 10,15g NaHCO₃, 1,95g KCl in 1000ml destilliertem Wasser.

2. Material und Methoden

Von diesem hergestellten Tyrodes Puffer wurden je 20ml steril in 50ml Falcons verteilt. Aus den fertig zentrifugierten Falcons mit dem Vollblut wurde nun das plättchenreiche Plasma abpipettiert und in die Falcons mit dem Tyrodes Puffer gegeben. Anschließend wurde das Volumen der Falcons mit übriggebliebenem Tyrodes Puffer auf 35ml erhöht. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 2100 Umdrehungen/Minute für 10 Minuten mit Bremse.

Der Überstand in den Falcons wurde danach verworfen und das Pellet mit wenig PBS resuspendiert. War bei dem Pellet eine Verklumpung (=Aktivierung) der Thrombozyten zu erkennen, wurde das gesamte Pellet verworfen.

Die Konzentration der Thrombozyten nach Suspension des Pellets wurde mit Hilfe des Sysmex KX-21N™ Automated Hematology Analyzer bestimmt.

Anlegen der Monozyten-Thrombozyten-Kokultur

Die Kokulturen wurden wie die Monokulturen in 96-well plates angelegt. Die Zellzahl pro Kammer an Monozyten war wie bei den Monokulturen 100000, anstatt der Zugabe von acLDL an Tag 5 und 10 wurden jetzt aber pro Kammer 4×10^7 Thrombozyten hinzugegeben. Das Volumen einer jeden Kammer wurde nach Zugabe der Monozyten und Thrombozyten mit dem RPMI-Medium complete auf 100µl aufgefüllt.

Der Aufbau der einzelnen Ansätze und das weitere Vorgehen entspricht dem der Monokultur, einzige Ausnahme war, wie beschrieben, dass nicht zusätzlich acLDL hinzugegeben wurde.

2.2.1.4 verschiedene Versuchsreihen

Insgesamt wurden drei verschiedene Versuchsreihen durchgeführt. Allen gemeinsam ist, dass sie mindestens die Ansätze wie in Abbildung 5 enthalten.

Versuchsreihe 1 wurde sowohl in Mono-, als auch in Kokultur durchgeführt, aufgrund besser auswertbarer Ergebnisse wurde ab Versuchsreihe 2 nur noch mit Kokulturen gearbeitet.

2. Material und Methoden

In Versuchsreihe 2 wurden zusätzlich zu den bereits in Versuchsreihe 1 verwendeten Ansätzen drei weitere erstellt. Hierfür wurden die verschiedenen BMPs (BMP2, BMP4, BMP7) jeweils einzeln mit Grem1 in einem Eppendorf-Cup bei gleicher Konzentration wie in den Einzelansätzen 10 Minuten vorinkubiert und anschließend in die Zellkultur gegeben.

Zusätzlich wurden ab dieser Versuchsreihe nach Abschluss der Kultur an Tag 14 die Überstände jedes Ansatzes entnommen und eingefroren.

In der 3. Versuchsreihe wurde dieser neue Ansatz der 2. Versuchsreihe noch durch Zugabe von MIF kombiniert. MIF und Grem1 wurden 10 Minuten vorinkubiert und anschließend dann entweder BMP2, BMP4 oder BMP7 hinzugegeben, nochmals 10 Minuten inkubiert und daraufhin in die dafür vorgesehenen Kammern der Zellkulturplatte pipettiert.

Für alle Versuchsreihen gilt, dass die Proteine bzw. deren Kombinationen 2x an den Tagen 5 und 10 der Kultur zugeführt wurden.

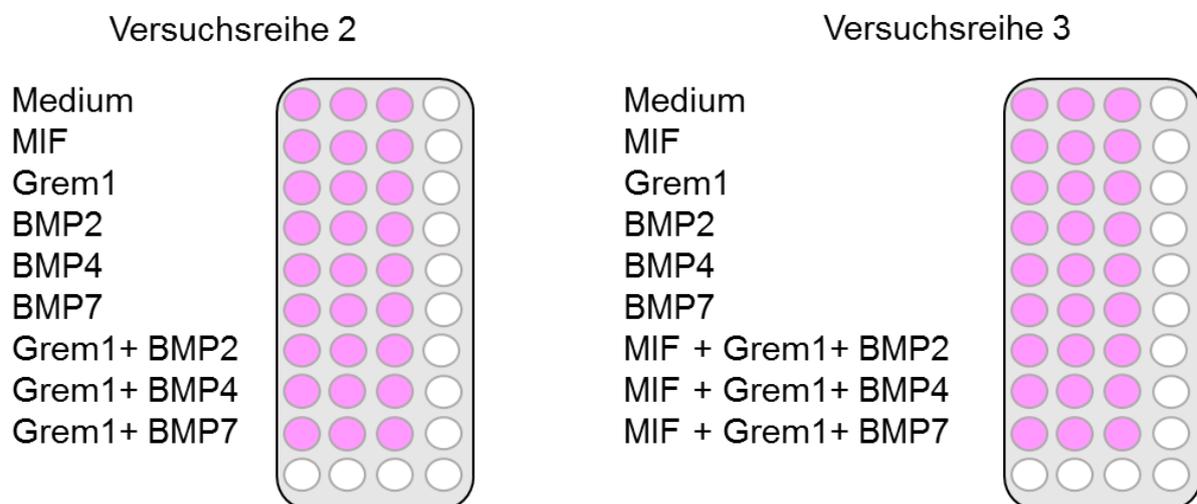


Abbildung 6: Anordnung der verschiedenen Ansätze in den einzelnen wells der Zellkulturplatten. Auf der linken Seite sind 9 verschiedene Ansätze mit jeweils 3 befüllten wells dargestellt, wobei im Vergleich zu den ersten Versuchen Kombinationen aus Grem1 und den BMPs hinzugekommen sind. Rechts hingegen sind ebenfalls 9 verschiedene Ansätze vorhanden, in denen zusätzlich zur Kombination von Grem1 + BMP noch MIF in diesen Ansätzen vorhanden ist.

2. Material und Methoden

2.2.2 Zytokin Array

2.2.2.1 theoretische Grundlagen des Zytokin Array

Um herauszufinden, wie sich die Zugabe der BMPs bzw. deren Kombinationen mit Gremlin-1 auf die Zytokinexpression in den Kokulturen auswirkt, wurde ein Zytokin Array durchgeführt, der 60 verschiedene Zytokine einer Probe gleichzeitig bestimmen kann.

Die Funktionsweise dieses Arrays ist folgende (s.a. Abbildung 7): auf einer vorgefertigten Membran sind auf definierten Bereichen Antikörper fixiert, die spezifische Zytokine binden. Hierbei ist jeder Bereich mindestens doppelt angelegt, um das Risiko falscher Ergebnisse zu verringern. Wird nun die Probe auf diese Membran gegeben, um über eine gewisse Zeit zu inkubieren, so binden die Antikörper der Membran die in dem Zellüberstand vorhandenen Zytokine. Durch Entfernen der Probe nach der Inkubation und anschließende Waschschriffe werden nicht gebundene Zytokine und andere Bestandteile der Probe entfernt. Im nächsten Schritt wird ein Antikörpergemisch hinzugegeben und inkubiert, wobei an die Antikörper Biotin gebunden ist. Diese Antikörper binden nun an andere Stellen der Zytokine, sodass ein sogenannter „sandwich-Komplex“ entsteht, d.h. dass die Zytokine beidseits von Antikörpern besetzt sind. Nachdem nicht gebundene biotinylierte Antikörper entfernt und ausgewaschen wurden, wird in einem dritten Schritt HRP-Streptavidin hinzugegeben. Dies bindet nun an das Biotin des 2. Antikörpers und kann dann nach einer gewissen Inkubationszeit mit Hilfe von Chemilumineszenz dargestellt werden. Damit nicht gebundenes HRP-Streptavidin das Ergebnis nicht verfälscht, müssen auch hier vor Anfertigung der Bilder sorgfältige Waschungen durchgeführt werden. Die Höhe der „Leuchtkraft“, in diesem Fall die Dichtemessung der Punkte auf den Membranen, ermöglicht Rückschlüsse auf die Konzentration des Zytokins in der ursprünglichen Probe.

2. Material und Methoden

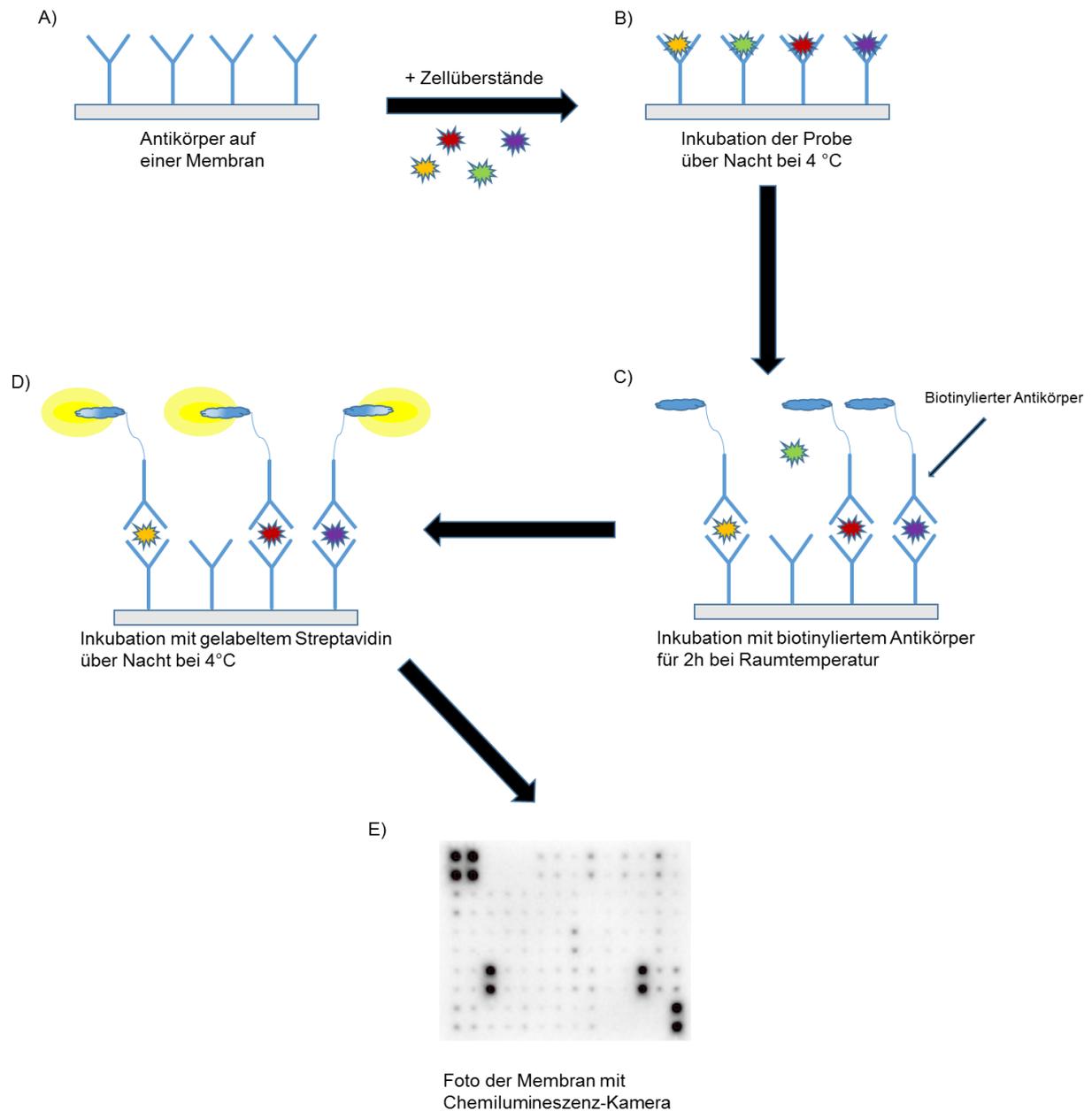


Abbildung 7: schematische Darstellung der Funktionsweise des Zytokin Array (nach ¹³⁸). A) auf der Membran befindliche spezifische Antikörper binden über Nacht (B) Zytokine aus den Kulturüberständen. C) nach einer Inkubation mit biotinylierten Antikörpern über 2h, die sich nur an gebundene Zytokine anlagern, wird der Membran gelabeltes Streptavidin zugegeben (D), dessen Leuchtkraft am nächsten Tag mit Hilfe einer Chemilumineszenzkamera gemessen wird

2. Material und Methoden

2.2.2.2 Durchführung des Zytokin Array

Vor Beginn der Durchführung des Arrays, mussten Bestandteile des mitgelieferten Kits vorbereitet werden. Die genaue Durchführung des Arrays war dem beigefügten Manual zu entnehmen, welches nur in wenigen Aspekten noch modifiziert wurde ¹³⁸.

Die Überstände der zu untersuchenden Kultur wurden nach dem Auftauen mit 10000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert und anschließend je 300µl Probe mit 700µl des beigefügten Blocking Buffers vermischt.

Die Membranen des Arrays wurden daraufhin in die Kammern der Inkubationsplatte gelegt, wobei die mit einem „+“ markierten Seiten nach oben zeigen mussten. Alle nun folgenden Schritte wurden abgesehen von den schnell durchgeführten Pipettierungsschritten unter gleichmäßiger, aber langsamer Rotation durchgeführt. Zuerst wurde zu jeder Membran 2ml des Blocking Buffer zugegeben und diese dann 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Flüssigkeit komplett abpipettiert und jede Probe (300µl Zellkulturüberstand mit 700µl Blocking Buffer) zu jeweils einer Membran zugefügt. Da insgesamt 8 Membranen zur Verfügung standen, jedoch insgesamt 9 verschiedene Überstände der Kultur vorlagen, wurde der Überstand des MIF-Ansatzes nicht verwendet. Unter der gleichmäßigen Rotation wurde die Inkubationsplatte über Nacht bei 4°C im Kühlraum gelagert.

Am nächsten Tag wurde zu Beginn die Probe mit Hilfe von Pipetten entnommen und es folgte der erste Waschschrift. Dafür waren 2 verschiedene Washing Buffer in dem Kit enthalten, die vor Gebrauch mit destilliertem Wasser 20fach verdünnt wurden. 2ml dieses verdünnten Washing Buffer 1 wurden in jede Kammer pipettiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entnahme des Washing Buffers wurde dieser Vorgang 2x wiederholt, bis jede Membran insgesamt 3x mit dem Washing Buffer 1 behandelt wurde. Das gleiche Prozedere wurde daraufhin mit dem Washing Buffer 2 wiederholt, bis auch dieser 3x angewendet wurde.

Als nächstes kam der biotinylierte Antikörper-Cocktail zum Tragen, der vor Gebrauch mit 1000g zentrifugiert und mit 2ml des Blocking Buffer verdünnt wurde.

2. Material und Methoden

Von diesem vorbereiteten Antikörper-Cocktail wurde in jede Kammer 1ml pipettiert und bei Raumtemperatur und ständiger Rotation für 2h inkubiert. Nach den 2h wurde er wieder komplett entfernt und es folgten die gleichen 6 Waschungen, wie nach dem Entfernen der Probe.

Anschließend wurde HRP-Streptavidin verwendet, welches mit Blocking Buffer 1:1000 verdünnt und bei 1000g zentrifugiert wurde. Von dieser Lösung wurden in jede Kammer 2ml gegeben und über Nacht bei 4°C im Kühlraum inkubiert.

Am darauffolgenden Tag folgte nach Entnahme des HRP-Streptavidins wiederum die oben bereits beschriebene Waschung.

Bei den nächsten Schritten musste sorgsam darauf geachtet werden, dass die Membranen nie komplett austrockneten, da das zu Problemen bei der Auswertung der Bilder führen könnte. Die Membranen wurden aus den Kammern entnommen, auf ein Papier gelegt und erkennbar übriggebliebener Washing Buffer abgetupft. Hiernach wurden die Membranen erneut auf eine Art (im Kit enthaltene) Plastikfolie transferiert. Direkt im Anschluss wurde auf jede Membran ein Gemisch aus Detection Buffer A+B (je 250µl, davor zusammenpipettiert) gegeben und für 2 Minuten inkubiert.

Daraufhin wurde eine zweite Plastikfolie auf die Membranen von oben gelegt und zwar so, dass diese möglichst nicht nachträglich verschoben wird, da es sonst durch Verschmierung zu verfälschten Ergebnissen kommen könnte. Von diesen Membranen wurden anschließend mit Hilfe einer Chemilumineszenzkamera Fotos nach verschiedenen Belichtungszeiten geschossen, wobei sich als optimale Belichtungszeit in diesem Setting 5 Sekunden herausgestellt hat.

2. Material und Methoden

2.2.3 statistische Auswertung

Die Auszählung der sich aus den Monozyten differenzierten Makrophagen und Schaumzellen wurde mit Hilfe des Programms ImageJ vorgenommen, ebenso wie die Dichtemessung der Membranen des Cytokine Array. Die erhaltenen Werte aus der Dichtemessung der einzelnen Membranen waren so aber noch nicht vergleichbar, da nicht auf allen Membranen ein gleich starkes Signal der Positiv-Kontrollen gemessen wurde, was zum einen an unterschiedlichen Belichtungszeiten und zum anderen an unterschiedlicher Hintergrundstrahlung liegen kann. Daher wurde der mittlere Wert der Positiv-Kontrollen der Kontrollmembran mit Medium durch den entsprechenden Wert der anderen Membranen geteilt und alle weiteren Werte jeder einzelnen Membran mit dem erhaltenen Koeffizienten multipliziert. Dies gewährleistet eine bessere Vergleichbarkeit der Werte der einzelnen Membranen. Die statistische Auswertung der Zellkulturreihen wurde mit SPSS 23 für Windows erstellt, wobei für den Vergleich der Mittelwerte der students t-Test für gepaarte Stichproben verwendet wurde. Als statistisch signifikant werden hierbei p-Werte $<0,05$ bezeichnet. Die Säulendiagramme mit den eingezeichneten Standardabweichungen der Mittelwerte der einzelnen Ansätze wurden mit dem Programm GraphPad Prism generiert.

Eine statistische Auswertung des Zytokin Arrays war nicht möglich, da der Array pro Protein bzw. Kombination nur 1x durchgeführt wurde und daher, auch wenn jeder Wert pro Membran mindestens doppelt bestimmt werden konnte, keine weiteren vergleichbaren Werte vorlagen. Folglich kann nur ein Trend angegeben werden.

3. Ergebnisse

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss von BMP2, BMP4 und BMP7 auf die quantitative Entstehung von Makrophagen/Schaumzellen

3.1.1 Versuchsaufbau

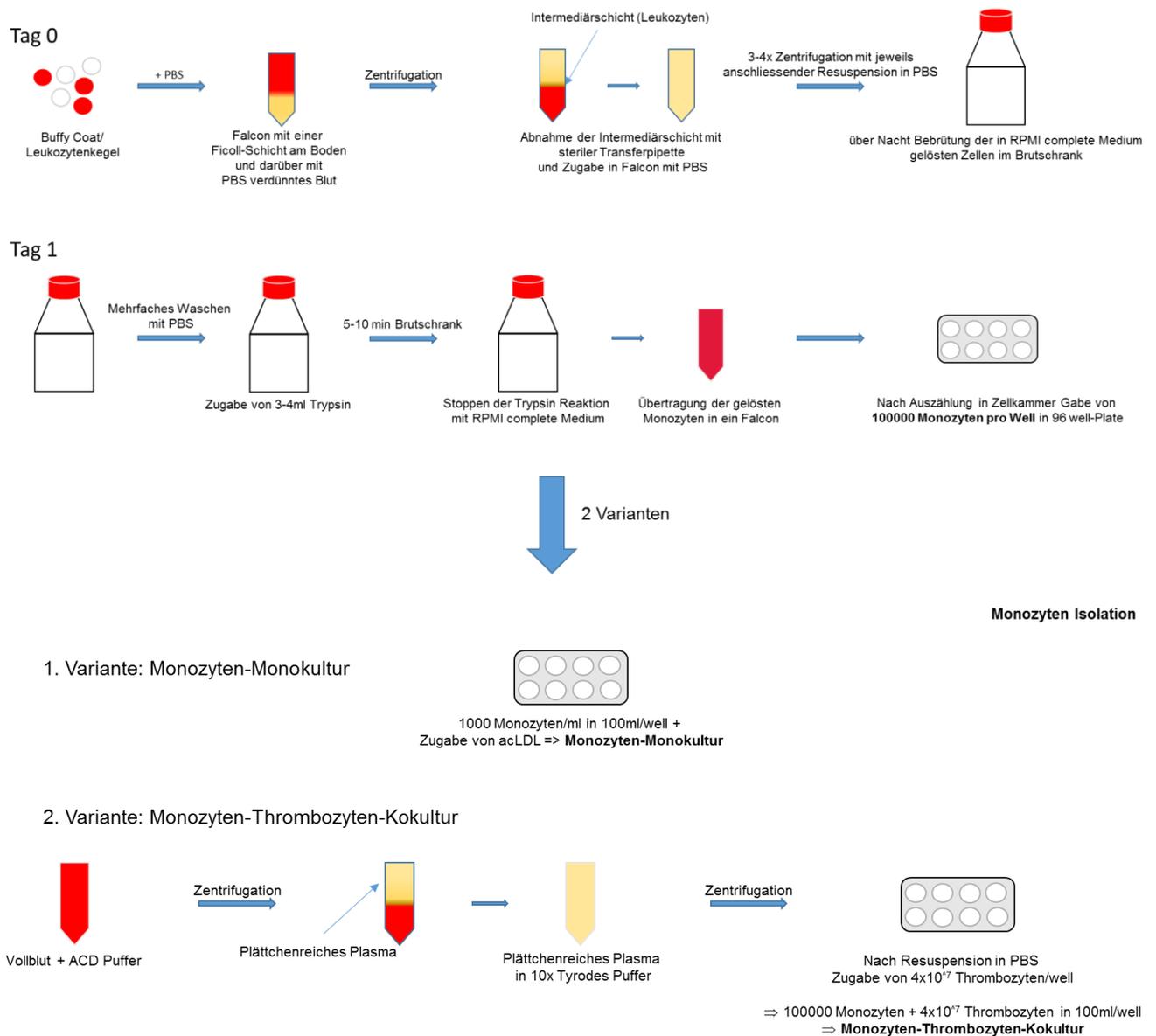


Abbildung 8: schematische Darstellung des Anlegens von Monozyten-Monokultur (Variante 1) und Monozyten-Thrombozyten-Kokultur (Variante 2).

Die genaue Durchführung ist unter 2.2.1. Anlegen der Zellkulturen beschrieben.

3. Ergebnisse

3.1.2. Vergleich der Monozyten-Monokultur mit der Monozyten-Thrombozyten-Kokultur

Dass durch den beschriebenen Versuchsaufbau aus den Monozyten Makrophagen und Schaumzellen entstehen, wurde bereits nachgewiesen ¹³⁹. Es stellte sich jedoch nach wenigen Kulturen heraus, dass es bei den Kokulturen mit Monozyten und Thrombozyten zu einer insgesamt deutlich besser erkennbaren Monozyten-Differenzierung zu Makrophagen und vor allem Schaumzellen kam, als bei der Monozyten-Monokultur (+acLDL), sodass entschieden wurde, künftige Versuche mit den Zellkulturen als Kokulturen durchzuführen. Eine Auswertung dieses ersten Versuchsansatzes erfolgte ausschließlich bei den Kokulturen.

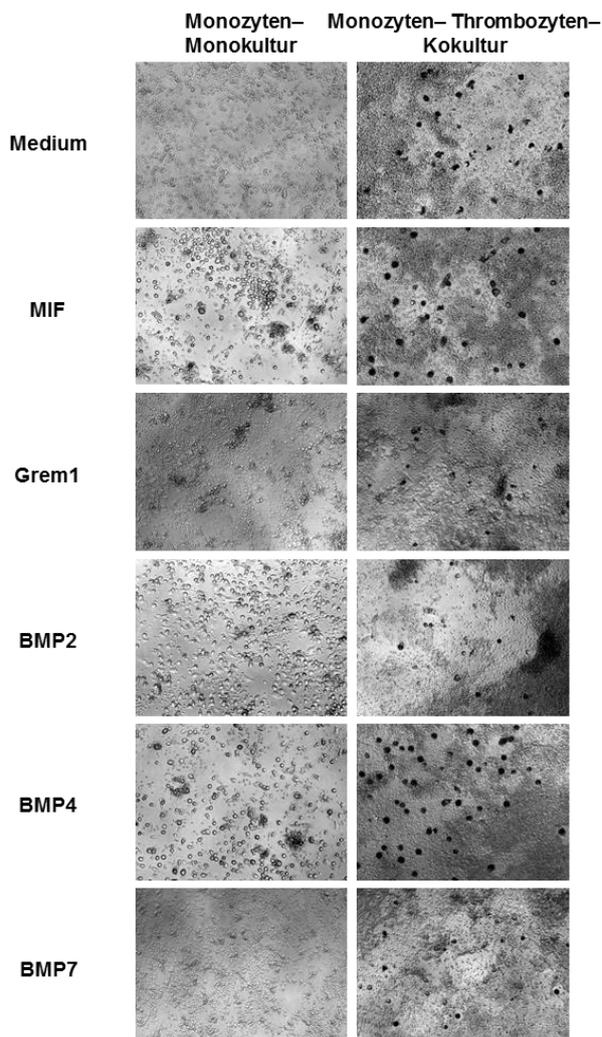


Abbildung 9: Vergleichende Darstellung von Mono- und Kokultur.

In der ersten Spalte wurde eine Monozyten-Monokultur angelegt wurde, in der zweiten Spalte eine Monozyten-Thrombozyten-Kokultur. Die Bilder sind jeweils am 11. Tag nach Anlegen der Kultur entstanden.

3. Ergebnisse

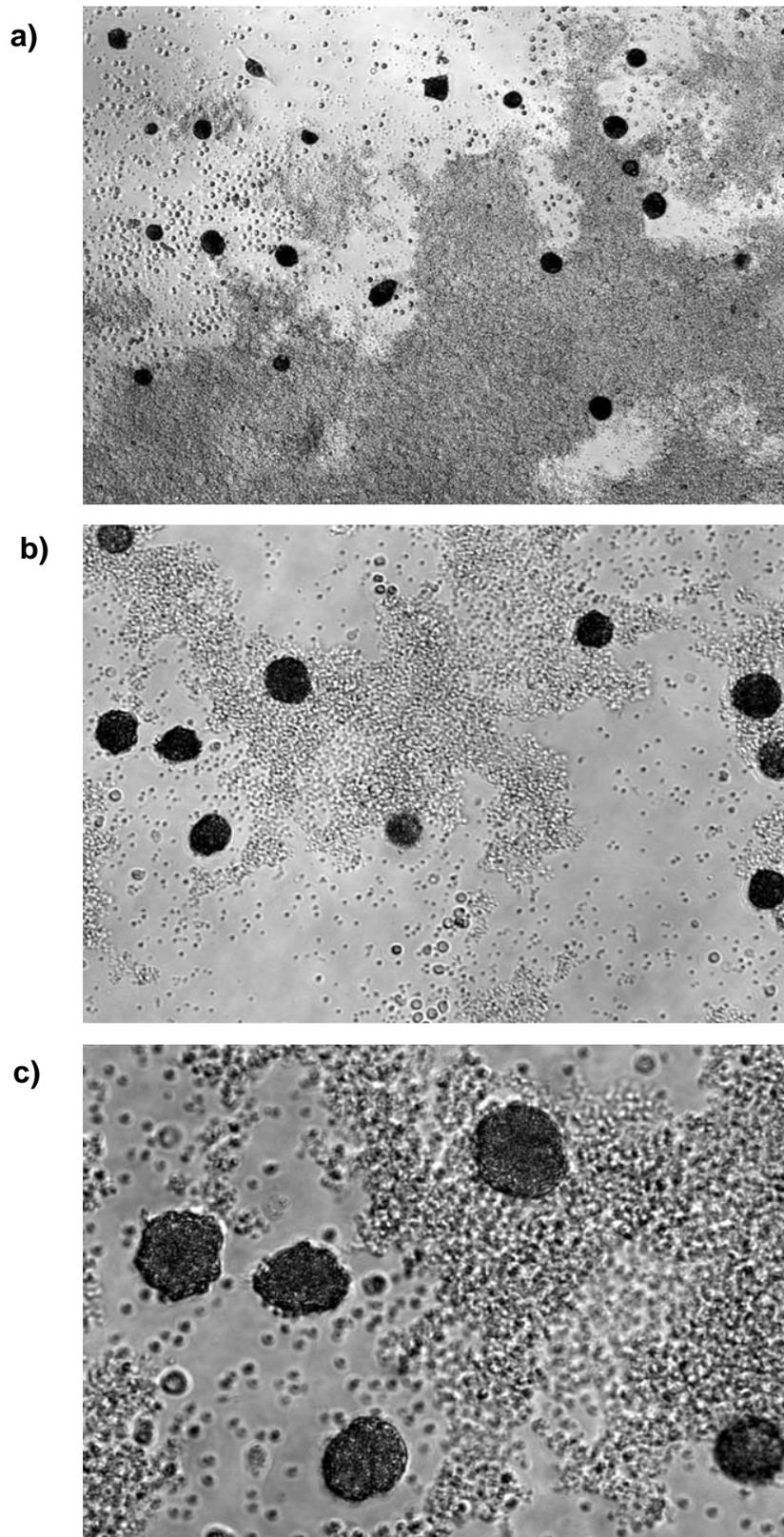


Abbildung 10: Bilder einer Zellkultur in verschiedenen Vergrößerungen. Beispielhafte Bilder einer Monozyten-Thrombozyten-Kokultur (MIF-Ansatz) in a) 10facher, b) 20facher und c) 40facher Vergrößerung. Zu sehen sind zu Schaumzellen differenzierte Monozyten

3. Ergebnisse

3.1.3 Einfluss von BMP2, BMP4, BMP7 auf die Entstehung von Makrophagen/Schaumzellen aus Monozyten

3.1.3.1. BMPs in Einzelansätzen

In Abbildung 10 sind beispielhaft Fotos dargestellt, wie sie von jeder Kultur erstellt wurden. Von jedem Ansatz an Tag 8, 11 und 14 wurden so anfangs 3, später 5 Bilder in 10facher, 20facher und 40facher Vergrößerung angefertigt, wobei die Bilder in 10facher Vergrößerung herangezogen wurden, um die entstandenen Makrophagen und Schaumzellen zu zählen. Daraus wurde der Mittelwert errechnet.

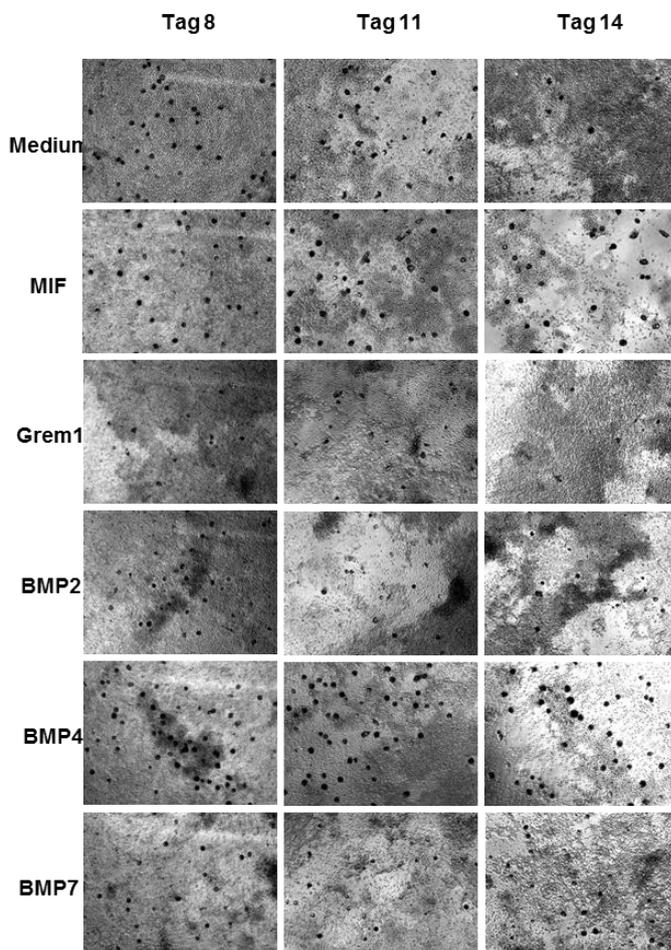


Abbildung 11: Entwicklung der Zellkulturen unter Einfluss der BMPs. Fotos der Kulturen in 10x Vergrößerung der ersten Kokulturen, bei denen die Proteine Grem1, BMP2, BMP4, BMP7 in getrennten Ansätzen an Tag 5 und Tag 10 in der Konzentration von 1µg/ml hinzugegeben wurden, die Konzentration von MIF betrug 10ng/ml. Dargestellt ist der Verlauf ab dem 3. Tag nach der 1. Proteingabe bis zum Ende des Versuchs an Tag 14.

3. Ergebnisse

In der statistischen Auswertung der ersten drei Zellkulturen, in denen die 6 verschiedenen Ansätze, wie sie auf Abbildung 5 gezeigt sind, angelegt wurden, zeigte sich, dass unter BMP4 Einfluss hoch signifikant ($p < 0,001$) mehr Makrophagen/Schaumzellen aus Monozyten entstanden sind als in der Medium-Kontrolle, wohingegen BMP2 ($p = 0,79$) und BMP7 ($p = 0,26$) sich nicht signifikant von der Medium-Kontrolle unterschieden haben. Die hier angegebenen p-Werte vergleichen die Mittelwerte der BMP-Ansätze mit denen des Mediumansatzes, in dem keine zusätzlichen Proteine von außen hinzugegeben wurden. Der MIF-Ansatz sowie der Grem1-Ansatz dienten als Positiv- und Negativ-Kontrollen, da deren Wirkung, nämlich dass sich MIF positiv auf die Makrophagen-/Schaumzellendifferenzierung auswirkt, Grem1 hingegen negativ, bereits mehrfach nachgewiesen wurde.

Tabelle 1: Mittelwerte der Kulturen der ersten Versuchsreihe mit n=3

	Medium	MIF	Grem1	BMP2	BMP4	BMP7
Tag 8	16,3	19,3	7	15	24	13
	8,2	11,8	4,4	6,2	10,2	7,8
	8,3	14,2	5,7	7,7	18,3	11,3
Tag 11	9,3	18	5	5,7	17	6,3
	8,4	13,4	3	6,8	12,4	9,4
	9	12,5	5,7	12	14,3	15,3
Tag 14	4	13,3	2	4,7	13,7	5,3
	6,8	11,8	2,8	6,6	11	7,8
	5,6	18,3	3	9,3	20,3	12,7

3. Ergebnisse

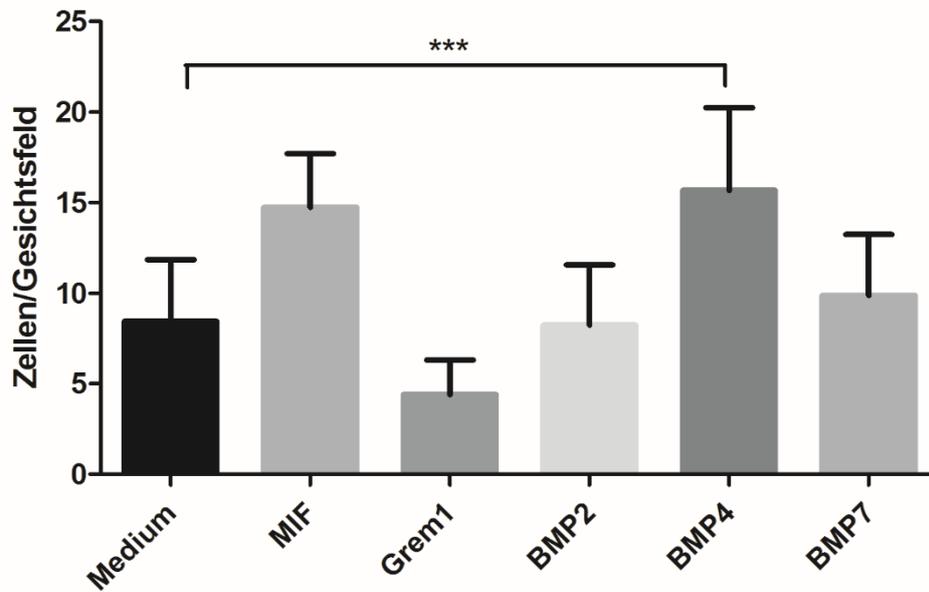


Abbildung 12: Einfluss der BMP-Einzelansätze auf die Entstehung von Makrophagen/Schaumzellen. Säulendiagramm zur Darstellung des Mittelwertes der in Tabelle 1 aufgeführten einzelnen Mittelwerte. Zusätzlich aufgeführt ist die Standardabweichung der Mittelwerte. Einzig BMP4 weist signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) gegenüber der Kontrolle mit Medium auf.

3. Ergebnisse

3.1.3.2. BMPs in Einzelansätzen und in Kombination mit Grem1

Nach Abschluss der vorhergehenden Versuchsreihe wurden die Ansätze dahingehend verändert, dass zusätzlich zu den 6 Standardansätzen (Medium als Kontrolle oder Zugabe von MIF, Grem1, BMP2, BMP4, BMP7) 3 neue Kombinationen getestet wurden. Da Grem1 ein Antagonist der BMPs ist, wurde in separaten Kammern der Zellkulturplatte jedes dieser BMPs einzeln mit Grem1 kombiniert, um die daraus resultierende Wirkung zu untersuchen. Grem1 und das jeweilige BMP wurden dafür 10 Minuten vorinkubiert, bevor sie in die Zellkultur gegeben wurden.

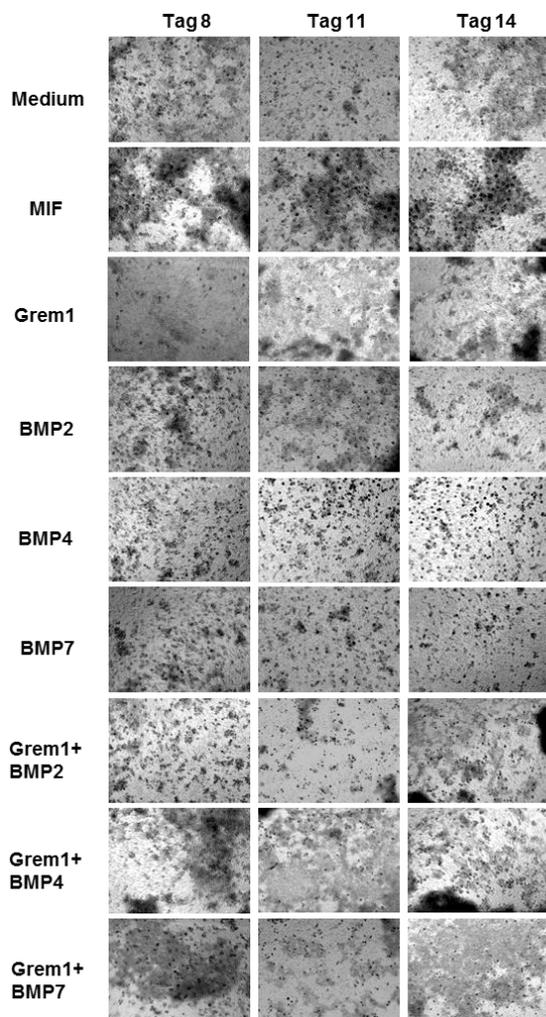


Abbildung 13: Vergleich der Entwicklung der Zellkulturen unter Kombination von Grem1 und BMPs mit Einzelansätzen. Fotos der Kulturen in 10x Vergrößerung der ersten Kokulturen, bei denen die Proteine Grem1, BMP2, BMP4, BMP7 einerseits in getrennten Ansätzen, sowie die Kombination aus Grem1 und BMP2, BMP4 und BMP7, an Tag 5 und Tag 10 in der Konzentration von 1µg/ml hinzugegeben wurden, die Konzentration von MIF betrug 10ng/ml. Dargestellt ist der Verlauf ab dem 3. Tag nach der 1. Proteingabe bis zum Ende des Versuchs an Tag 14.

3. Ergebnisse

Wie in den Abbildungen 13 und 14 zu sehen ist, verursachte die Hinzugabe von Grem1 zu den BMPs einen deutlichen Abfall in der Menge der entstandenen Makrophagen/Schaumzellen. Vergleicht man den BMP2 Ansatz mit dem, der Grem1 + BMP2 enthält, so ist eine signifikante Reduktion der Schaumzellbildung bei Kombination von BMP2 und Grem1 festzustellen (p-Wert = 0,0012). Auch beim Vergleich von BMP4 mit Grem1 + BMP4 (p-Wert 0,006) und BMP7 mit Grem1 + BMP7 (p-Wert = 0,0011) können wir vergleichbare Beobachtungen machen. Es zeigte sich, dass sich beispielsweise durch die Antagonisierung von BMP4 durch Grem1 der bereits beobachtete Effekt der verstärkten Monozytendifferenzierung zu Makrophagen und Schaumzellen aufheben bzw. abmindern lässt.

Tabelle 2: Mittelwerte der Kulturen der zweiten Versuchsreihe mit n=4

	Medium	MIF	Grem1	BMP2	BMP4	BMP7	Grem1 +BMP2	Grem1 +BMP4	Grem1 +BMP7
Tag 8	9,2	9	7	7	8,6	8,2	7,6	8,6	5,4
	8	10,8	4,4	8,4	9,2	7	6,4	9	6,8
	11,6	10,6	4	8,8	12,6	10,8	7,4	5,4	5,6
	8,4	13,4	4,8	8	14,4	8	8,8	6	7,6
Tag 11	7,2	9,2	4	6,6	9,4	10	4	7	5,2
	5,4	8,4	2,8	6,4	8,6	6,8	3,2	5,8	4,8
	11	16	3,6	10,3	22,8	17,6	3,6	6,6	3,8
	6	14,6	3,6	8,6	11,6	12,4	4	9,4	6,4
Tag 14	6,4	10,6	2,4	4,8	10,4	10	3	5,8	5,2
	8,6	8,4	2,2	6,2	12	7,4	2,6	5,2	3
	9,4	21,2	3,2	10,2	24,4	16,2	4,8	6,2	4,2
	5	13,8	5,2	8,2	14	17,6	4,6	12,8	6,8

3. Ergebnisse

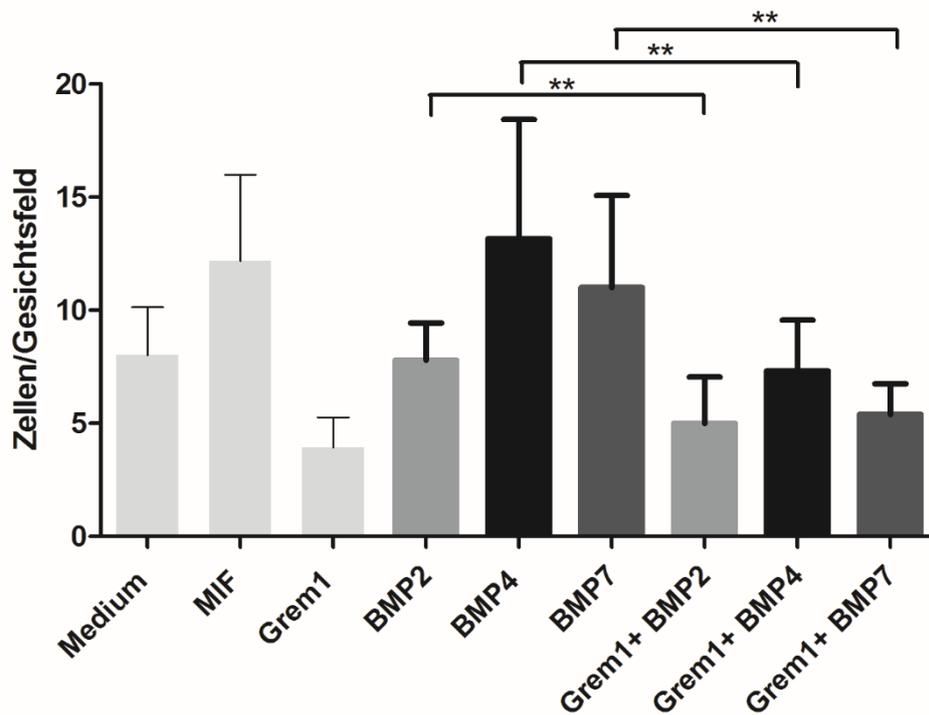


Abbildung 14: Einfluss der Zugabe von Grem1 zu den BMPs. Säulendiagramm zur Darstellung des Mittelwertes der in Tabelle 2 aufgeführten einzelnen Mittelwerte. Zusätzlich aufgeführt ist die Standardabweichung der Mittelwerte. In den Ansätzen in denen die BMPs mit Grem1 kombiniert wurden, entstanden signifikant weniger Makrophagen/Schaumzellen, als in den reinen BMP Ansätzen.

3. Ergebnisse

Vergleichen wir die Zweifachkombinationen nicht mit dem entsprechenden BMP-Ansatz, sondern mit der Medium-Kontrolle, so zeigt sich, dass durch Grem1 nicht nur eine Reduktion der Schaumzellbildung im Vergleich zu den Ansätzen mit alleiniger BMP-Gabe bewirkt wurde, sondern dass bei BMP2 und BMP7 auch im Vergleich zum Kontrollansatz ohne Proteine eine deutliche Verringerung der Schaumzellentstehung bestand. Die Wirkung von Grem1 auf die quantitative Differenzierung der Monozyten scheint eine stärkere zu sein, als die von BMP2 und BMP7, sodass insgesamt eine Hemmung der Differenzierung zu beobachten war.

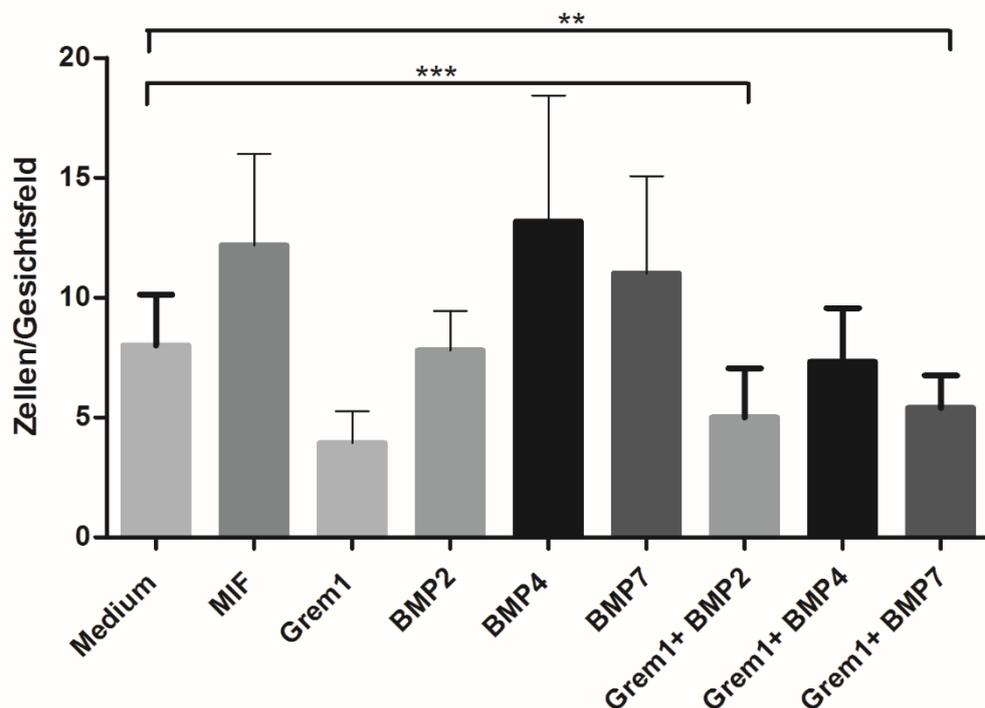


Abbildung 15: Einfluss der Zugabe von Grem1 zu den BMPs. Säulendiagramm zur Darstellung des Mittelwertes der in Tabelle 2 aufgeführten einzelnen Mittelwerte. Zusätzlich aufgeführt ist die Standardabweichung der Mittelwerte. In den Ansätzen in denen die BMP2 und BMP7 mit Grem1 kombiniert wurden, entstanden signifikant weniger Makrophagen/Schaumzellen, als im Medium-Ansatz.

3. Ergebnisse

3.1.3.3 BMPs in Einzelansätzen und in Kombination mit MIF und Grem1

Wie sich in den bereits beschriebenen Versuchen zeigte, wurde durch die Kombination mit Grem1 die Wirkung der BMPs reduziert. In einer abschließenden Reihe von Versuchen wurde nun untersucht, ob sich durch Zugabe von MIF eine Abschwächung der Grem1-Wirkung und damit fehlende Hemmung der BMPs nachweisen lässt. Hierfür wurden Grem1 und MIF in gleichen Konzentrationen wie in den Einzelansätzen (Grem 1µg/ml und MIF 10ng/ml) 10 Minuten vorinkubiert, anschließend nach dem Hinzufügen von dem jeweiligen BMP nochmals die gleiche Zeit inkubiert und erst danach in die Kultur gegeben.

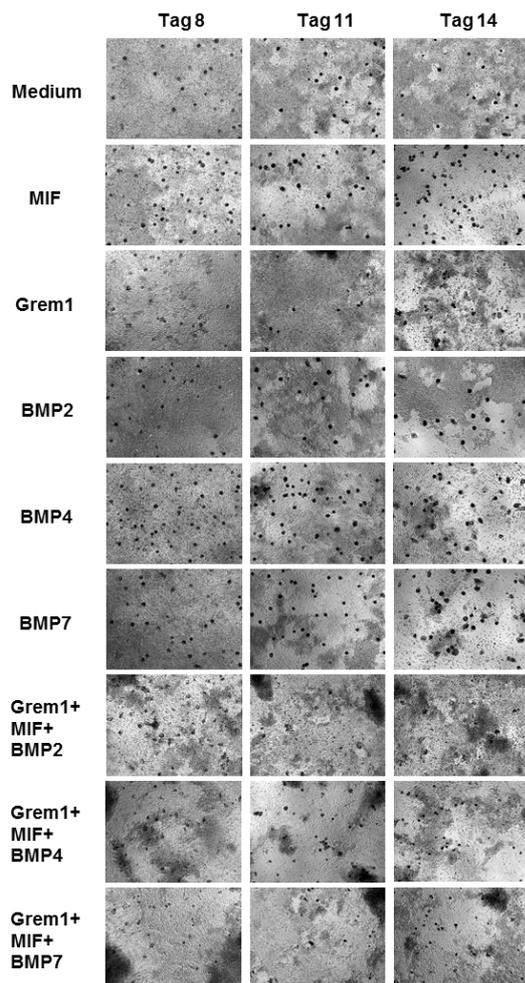


Abbildung 16: Vergleich der Entwicklung der Zellkulturen unter 3-fach Kombination der BMPs mit MIF und Grem1. Fotos der Kulturen in 10x Vergrößerung der ersten Kokulturen, bei denen die Proteine Grem1, BMP2, BMP4, BMP7 einerseits in getrennten Ansätzen, sowie die Kombination aus Grem1 und BMP2/4/7, an Tag 5 und Tag 10 in der Konzentration von 1µg/ml hinzugegeben wurden, die Konzentration von MIF betrug 10ng/ml. Dargestellt ist der Verlauf ab dem 3. Tag nach der 1. Proteingabe bis zum Ende des Versuchs an Tag 14

3. Ergebnisse

Im Säulendiagramm von Abbildung 17 lässt sich deutlich sehen, dass es trotz Hinzugabe von MIF bei Kombination von Grem1 mit den BMPs wiederum zu einer signifikant reduzierten Monozytendifferenzierung zu Makrophagen und Schaumzellen gekommen ist. Die Werte der Dreifachkombination mit BMP4 und BMP7 unterscheiden sich nicht signifikant von denen der Medium-Kontrolle, bei der Dreifachkombination mit BMP2 entstehen weniger Makrophagen/Schaumzellen als im Medium ($p = 0,03$). Vergleicht man die Mittelwerte der kombinierten Ansätze mit denen der Einzelproteine, so sind diese für alle 3 untersuchten BMPs in der Kombination signifikant niedriger (BMP2 und MIF+Grem1+BMP2 $p = 0,0014$, BMP4 und MIF+Grem1+BMP4 $p < 0,001$ und BMP7 und MIF+Grem1+BMP7 $p = 0,0061$).

Tabelle 3: Mittelwerte der Kulturen der dritten Versuchsreihe mit n=5

	Medium	MIF	Grem1	BMP2	BMP4	BMP7	MIF +Grem1 +BMP2	MIF +Grem1 +BMP4	MIF +Grem1 +BMP7
Tag 8	11,2	8,4	4,6	9	9,8	9	8,2	9,2	7
	10,6	10,4	4	8,4	11,8	9,8	10,4	11,4	9,8
	7,4	12,2	9,4	10,4	9,2	8,2	10,2	10,4	9
	9,4	19	7	7,6	10,8	10,4	5,2	4,6	5,6
	10,4	20,4	6	13,6	23,6	17,2	6,6	6,8	6
Tag 11	9,2	10,8	5,4	12,2	12,4	13,8	7	6,8	7,4
	9,8	10,4	4,2	10,8	15	10,8	11	12,6	17,2
	9,2	13,2	6,4	8,2	10,4	9,6	7	8	6,4
	8	19,2	4,4	10,8	12,6	8,6	3	5	4,2
	10	17,6	5,8	14	23	21,6	5,4	8,8	4,4
Tag 14	9,6	13	4	12,2	15,5	18	7,2	7,2	9,2
	9	16,4	3	14,6	23,2	17,2	13,8	20,2	19
	8	15,4	3	8,6	17,8	13	6,4	6,2	5,6
	6,8	20,4	5	11,2	14,8	11,4	5,4	6,4	4
	9,2	19,6	5,2	12,2	19,6	15,2	4	7,2	5,2

3. Ergebnisse

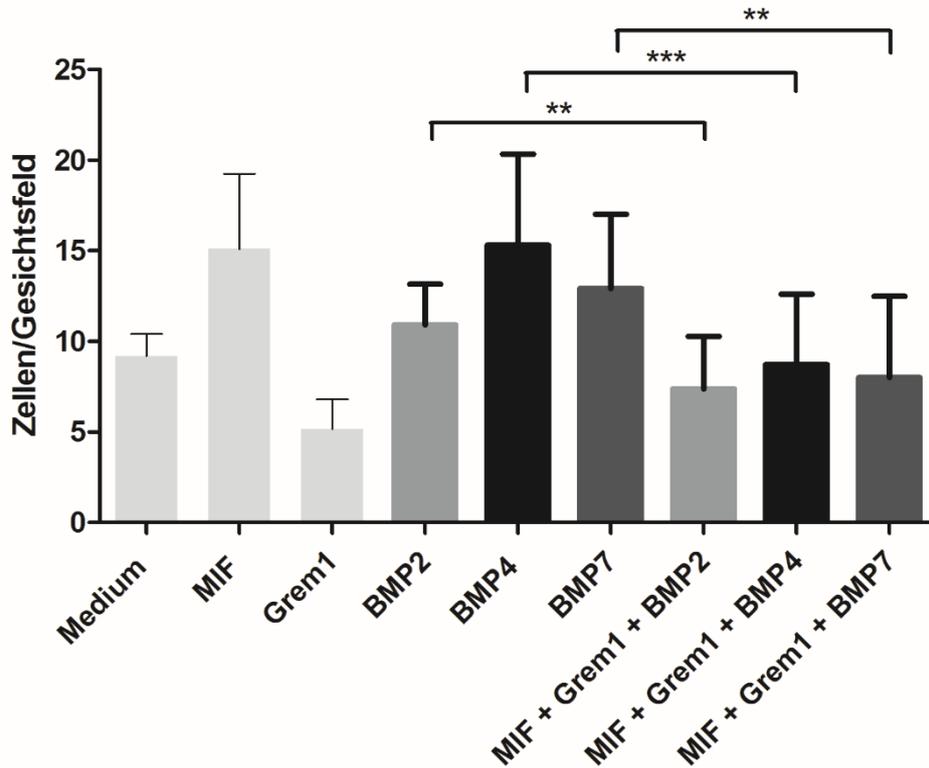


Abbildung 17: Einfluss der Gabe von MIF und Grem1 zu den BMPs. Säulendiagramm zur Darstellung des Mittelwertes der in Tabelle 3 aufgeführten einzelnen Mittelwerte. Zusätzlich aufgeführt ist die Standardabweichung der Mittelwerte. In den Ansätzen in denen die BMPs mit MIF und Grem1 kombiniert wurden, entstanden signifikant weniger Makrophagen/Schaumzellen, als in den reinen BMP Ansätzen.

3. Ergebnisse

3.1.3.4 Verlauf über die einzelnen Tage

Betrachtet man den Verlauf über die 3 Tage, an denen Bilder der Kulturen erstellt wurden, so zeigt sich, dass je länger die Kulturen gewachsen sind, die Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen immer größer werden. An Hand der folgenden Abbildungen, die die Werte aller Kulturen darstellen (n=12), wird dies deutlich.

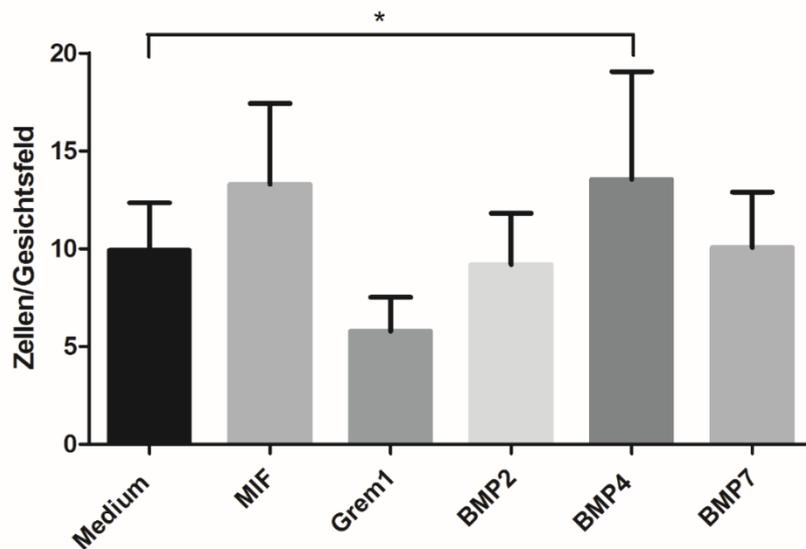


Abbildung 18: Makrophagen-/Schaumzellentstehung an Tag 8. Mittelwerte der Auszählung der Makrophagen/Schaumzellen an Tag 8 nach Anlage der Kultur. Ein signifikanter Unterschied ist an diesem Tag nur bei BMP4 festzustellen ($p = 0,0185$)

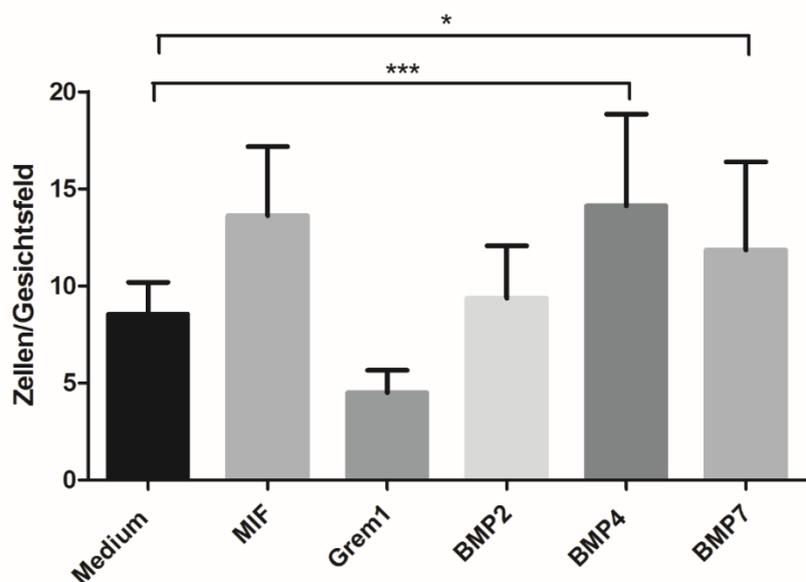


Abbildung 19: Makrophagen-/Schaumzellentstehung an Tag 11. Mittelwerte der Auszählung der Makrophagen/Schaumzellen an Tag 11 nach Anlage der Kultur. Der Unterschied zwischen Medium und BMP4 wird größer ($p < 0,001$) und zusätzlich wird auch die Differenz zwischen BMP7 und Medium nun signifikant ($p = 0,014$).

3. Ergebnisse

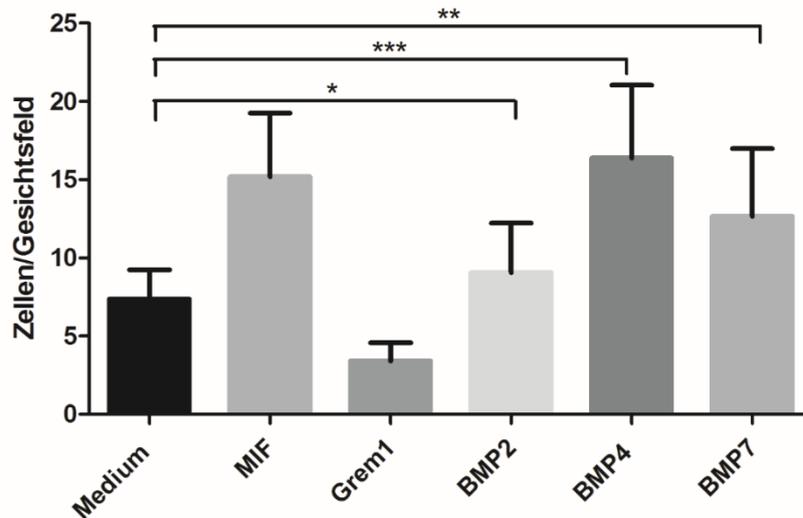


Abbildung 20: Makrophagen-/Schaumzellentstehung an Tag 14. Mittelwerte der Auszählung der Makrophagen/Schaumzellen an Tag 14 nach Anlage der Kultur. Im Vergleich zu Tag 11 ist eine weitere Progredienz der Unterschiede der Mittelwerte zwischen den verschiedenen Ansätzen festzustellen. Erstmals wird auch eine statistisch signifikante, wenn auch recht geringe Abweichung des BMP2 und Medium Ansatzes sichtbar ($p = 0,0345$).

An Tag 14 haben demnach alle BMPs eine signifikante Erhöhung der Monozytendifferenzierung zu Makrophagen/Schaumzellen bewirkt, wobei dieser Effekt vor allem bei BMP4 und an zweiter Stelle bei BMP7 bestand. In Abbildung 21 sind abschließend die Diagramme dargestellt, auf denen die Werte aller Tage kombiniert wurden.

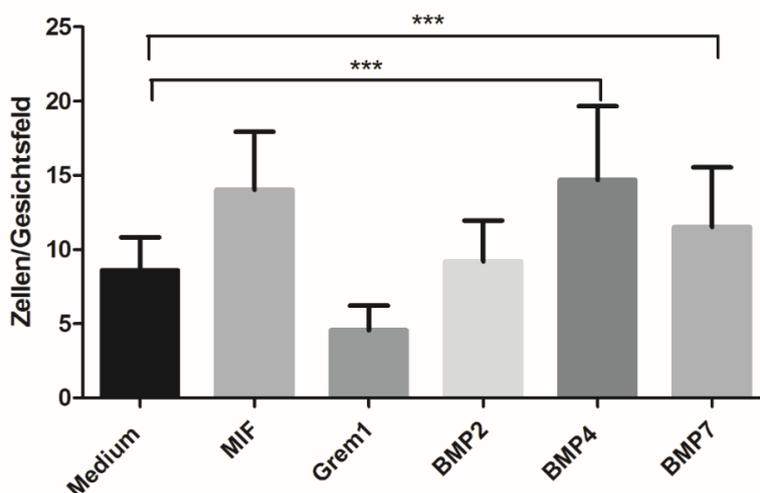


Abbildung 21: Makrophagen-/Schaumzellentstehung über alle Tage. Mittelwerte der Auszählung der Makrophagen/Schaumzellen der Tage 8, 11 und 14 ($n = 36$). Unter Hinzugabe von BMP4 und BMP7 zu den Kokulturen kam es zu einer hoch signifikanten Zunahme der Makrophagen/Schaumzellentstehung. Für BMP2 ließ sich dieser Effekt nur gering und nur an Tag 14 nachweisen.

3. Ergebnisse

3.2 Zytokin Array

Wie bereits bei den Methoden erwähnt, standen insgesamt 8 Membranen für 8 verschiedene Proben zur Verfügung. Da aber ab der 2. Versuchsreihe 9 verschiedene Ansätze pro Kultur erstellt worden sind, konnte 1 Ansatz nicht ausgewertet werden. Da das Hauptaugenmerk der Arbeit auf den BMPs und daran anknüpfend auf den Kombinationen der BMPs mit Gremlin1 lag, MIF hingegen primär als (Positiv-)Kontrollprotein verwendet wurde, wurde vom Überstand des MIF-Ansatzes kein Array angefertigt. Die Proben der durchgeführten Arrays stammten alle von derselben Kultur aus der 2. Versuchsreihe.

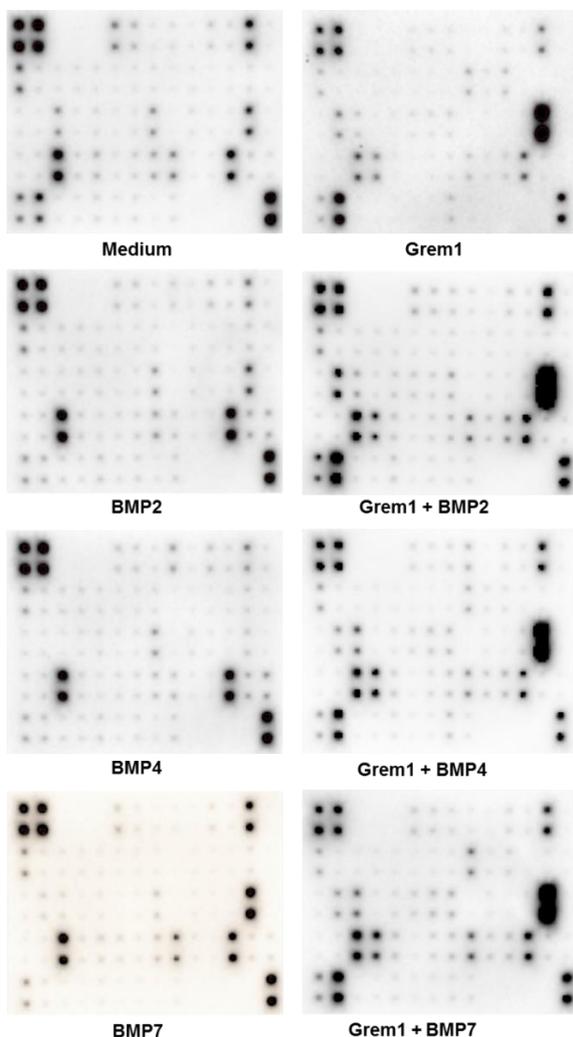


Abbildung 22: Darstellung der mit einer Chemilumineszenzkamera erstellten Bilder der Membranen des Zytokin Arrays

3. Ergebnisse

Die Membranen des verwendeten Zytokin Arrays haben die Probe auf 60 verschiedene Zytokine untersucht. Der Übersichtlichkeit halber und da bei der Auswertung der meisten Zytokine keine relevanten Unterschiede festzustellen waren, werden im Folgenden nur die 10 Zytokine näher ausgeführt, bei denen entweder Unterschiede in den einzelnen Ansätzen zu erkennen waren oder bei denen sich allgemein ein starkes Lumineszenzsignal (=hohe Konzentration) zeigte (s.a. Abbildung 22)

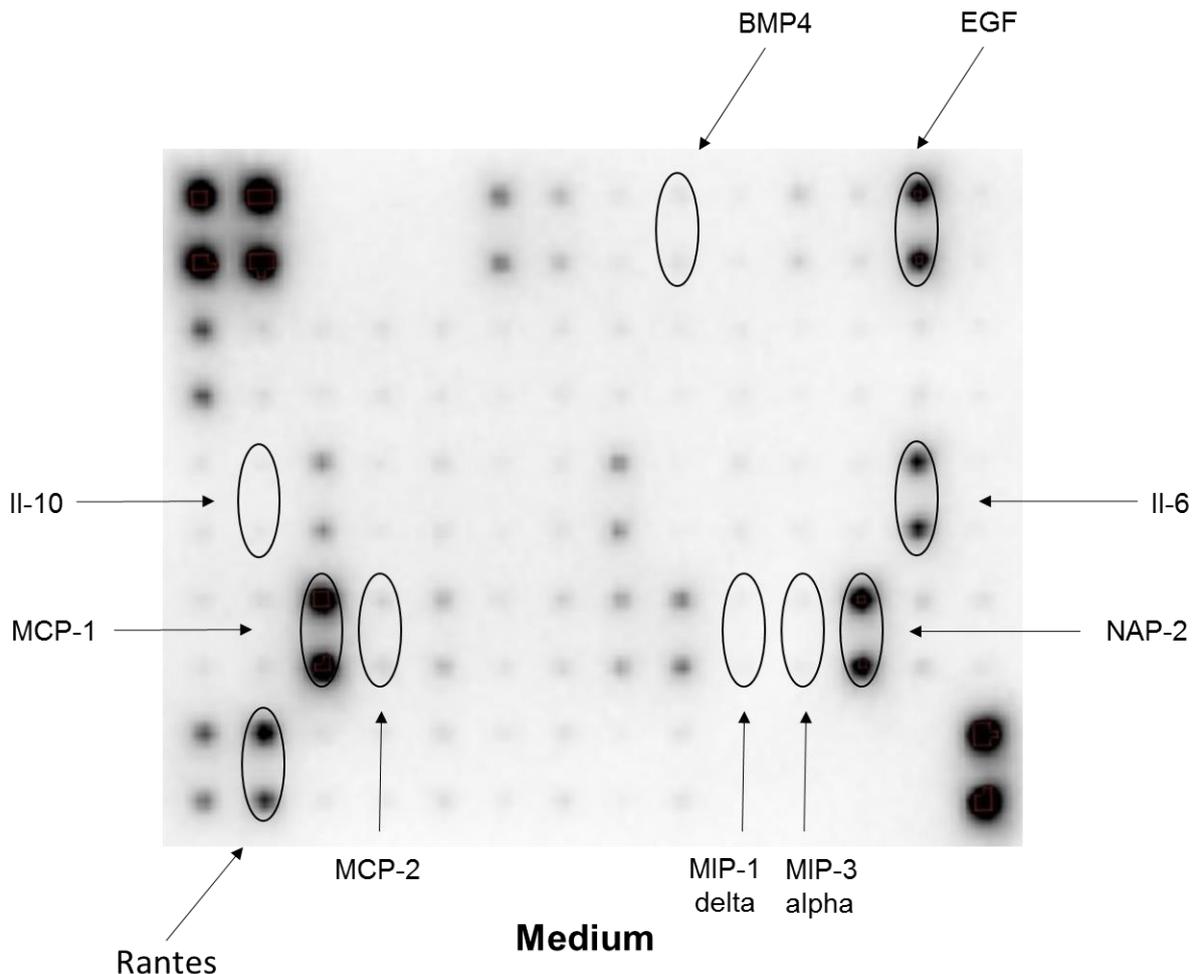


Abbildung 23: Darstellung einer Membran des Zytokin-Arrays durch eine Chemilumineszenz-Kamera. Beispielhaftes Foto einer Membran mit den markierten Bereichen der Zytokine, zu denen vergleichende Diagramme erstellt wurden. In der linken oberen Ecke und der rechten unteren Ecke sind jeweils die Positiv-Kontrollen zu erkennen.

3. Ergebnisse

3.2.1. Ergebnisse des Zytokin Arrays

Um eine bessere Vergleichbarkeit der einzelnen Werte zu erhalten, wurden die gemessenen Werte der Positivkontrollen (linke obere Ecke und rechte untere Ecke), wie bei den Methoden beschrieben, mit dem Positivkontrollwert der Membran der Mediumkontrolle verrechnet und anschließend alle weiteren Werte entsprechend mit dem Koeffizienten multipliziert.

Die Zytokine EGF, MCP-1 NAP-2 wiesen alle ein relativ deutliches Signal auf. Es sind geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Membranen festzustellen, die Abweichungen sind jedoch nicht allzu groß (s. Abbildung 24).

EGF (epidermal growth factor) ist ein Ligand des EGFR (epidermal growth factor receptor), der bei Aktivierung an der Regulierung diverser Zellprozesse wie beispielsweise der Transkription von Wachstumsfaktoren beteiligt ist ¹⁴⁰.

MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1; CCL-2) ist ganz entscheidend für die Entwicklung und Progression der Atherosklerose, da es die Migration von Monozyten reguliert und proinflammatorisch wirkt ¹⁴¹⁻¹⁴². Im vorliegenden Fall zeigte sich, dass unter Grem1 eine niedrigere Konzentration dieser beiden Zytokine festzustellen war, als in der Mediumkontrolle, sich die Werte bei Kombination von Grem1 mit den BMPs den jeweiligen Werten der Proben, in die nur BMP gegeben wurde, aber annäherten. Dass unter BMP-7 eine geringere Expression von MCP-1 erfolgt, wie in früheren Arbeiten gezeigt wurde ¹³³⁻¹³⁴, lässt sich hier wenn überhaupt nur ansatzweise erkennen.

NAP-2 (neutrophil activating protein-2) ist ein Chemokin, das sowohl in Thrombozyten, als auch in Monozyten/Makrophagen vorhanden ist ¹⁴³. Es stimuliert einerseits die Produktion von MCP-1 durch Endothelzellen, wirkt andererseits auch selbst chemotaktisch auf Monozyten und trägt damit zur Einleitung bzw. Aufrechterhaltung eines entzündlichen Vorganges bei ¹⁴⁴.

Als zusätzliche Positivkontrolle kann das Zytokin BMP4 gewertet werden, dessen Konzentration in den beiden Ansätzen (BMP4 & Grem1+BMP4), in die über die 14 Tage 2x BMP4 gegeben wurde, deutlich höher als in den anderen Ansätzen war.

3. Ergebnisse

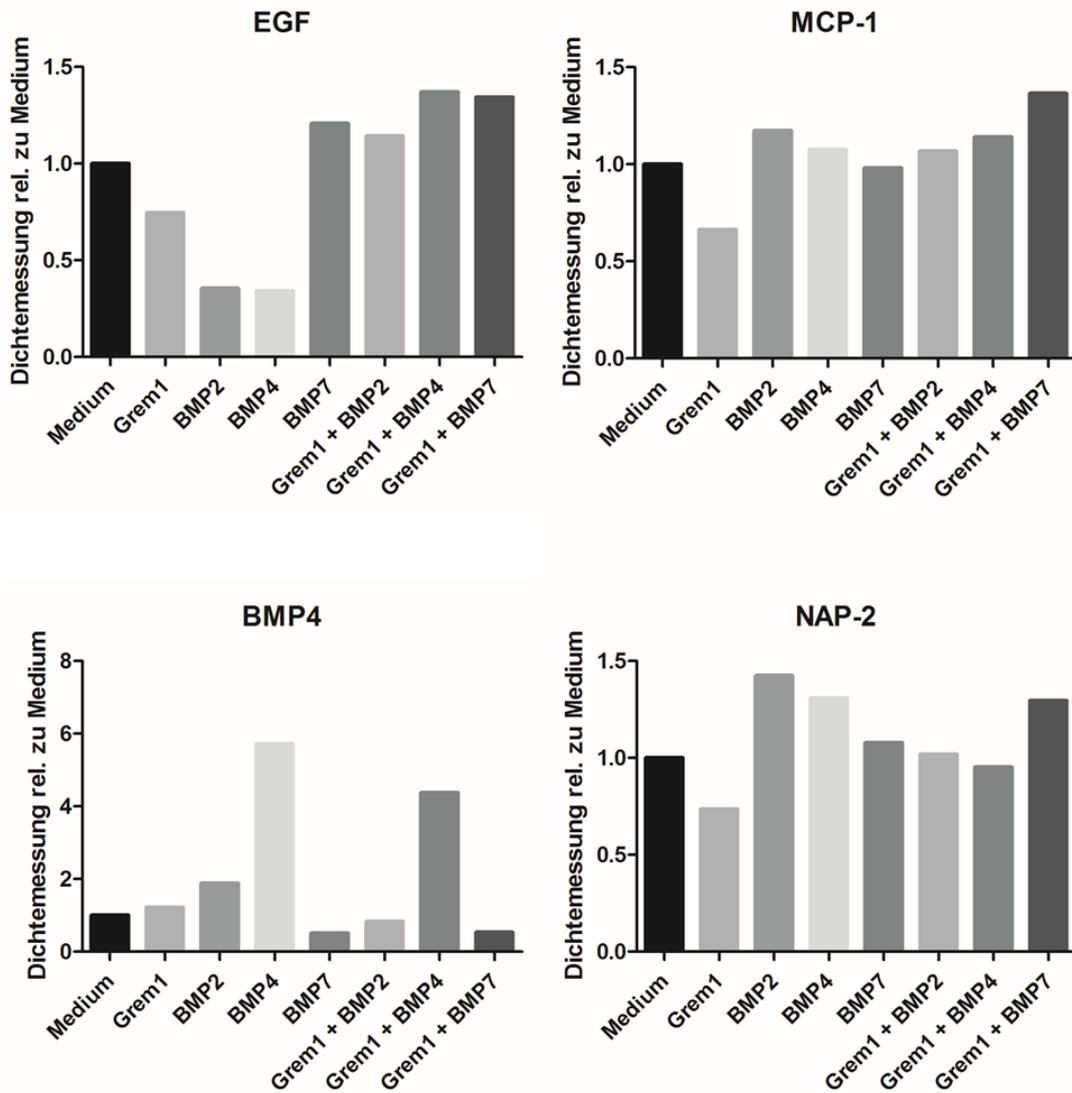


Abbildung 24: Zytokinexpression der verschiedenen Ansätze. Dargestellt sind Säulendiagramme der einzelnen Zytokine, wobei die einzelnen Werte immer relativ auf den Wert des Zytokins auf der Mediummembran (=1) angegeben sind.

3. Ergebnisse

Deutliche Unterschiede in ihrer Zytokinexpression wiesen Proben (Abbildung 25) mit und ohne Grem1 auf. Daher scheint Grem1 eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Expression verschiedener Zytokine in Monozyten, Makrophagen und Schaumzellen zu spielen.

MIP-1 delta (macrophage inflammatory protein-1) oder auch CCL15 gehört zur Gruppe der MIP-1 Chemokine und wird vor allem von stimulierten Immunzellen wie beispielsweise Monozyten/Makrophagen gebildet, es gibt jedoch Hinweise, dass geringe Mengen auch von nicht stimulierten Zellen gebildet werden ¹⁴⁵. Dem Namen entsprechend ist MIP-1 delta an entzündlichen Prozessen beteiligt ¹⁴⁶.

Das zweite untersuchte MIP-Chemokin, MIP-3 alpha oder auch CCL20, entfaltet seine Wirkung vor allem, in dem es dendritische Zellen zum Ort der Entzündung lockt ¹⁴⁷, spielt aber auch eine Rolle bei der Tumorentstehung und dem weiteren Krankheitsverlauf bei Tumorerkrankungen. Beim hepatozellulärem Karzinom (HCC) wurde beispielsweise nachgewiesen, dass die Höhe der Konzentration von MIP-3 alpha mit dem Tumorgrad korreliert ¹⁴⁸. Gebildet wird es unter anderem von Makrophagen und dendritischen Zellen. Bei beiden MIP-Zytokinen führte vor allem das Zusammenspiel von Grem1 und BMP zu einem erhöhten Signal, das dagegen in den Proben ohne Grem1-Zugabe nur sehr schwach ausgeprägt war.

MCP-2 lockt wie MCP-1 durch Chemotaxis Monozyten und Lymphozyten an ¹⁴⁹. Wie den Bildern zu entnehmen ist, war die Konzentration in den Proben der Membranen ohne Grem1 niedrig, besonders im Vergleich zu dem sich daneben befindenden MCP-1. Grem1 konnte die Konzentration deutlich steigern.

Rantes (Akronym für Regulation on Activation, Normal T Expressed and Secreted) oder CCL-5 ist ein Chemokin, das sowohl von Monozyten und Makrophagen, als auch von Thrombozyten synthetisiert wird ¹⁵⁰⁻¹⁵¹. Durch seine chemotaktische Wirkung lockt es im Rahmen der Atherosklerose Monozyten zu den Läsionen und unterhält damit die Entzündung ¹⁵². Wie die Diagramme illustrieren, zeigte sich eine erhöhte Aktivität unter Grem1 Substitution, während in den Proben von BMP2, BMP4 und BMP7 gegenüber der Mediumkontrolle eine deutlich verringerte Expression auszumachen ist.

IL-6 (Interleukin-6) gehört zur Familie der Interleukine, die modulierend an der Interaktion von Leukozyten und damit auch an Entzündungsreaktionen beteiligt sind. Interleukin-6 selbst wird von vielen verschiedenen Zellen produziert, darunter

3. Ergebnisse

befinden sich auch Monozyten und Makrophagen ¹⁵³. Die Funktionen von IL-6 sind sehr vielfältig, insgesamt ist es aber einer der Hauptvertreter der entzündungsfördernden Interleukine. Dabei ist es unter anderem am immunologischen Übergang von angeborener zu erworbener Immunantwort beteiligt und erhöht in Hepatozyten die Produktion von Akute-Phase-Proteinen ¹⁵⁴. Während es an Endothelzellen bewirkt, dass diese durch erhöhte Expression von ICAM Monozyten binden, stimuliert es Monozyten zur Expression von tissue factor, wodurch sich die Gefahr einer Thrombusbildung erhöht ¹⁵⁵.

In dem durchgeführten Array zeigte sich, dass die Konzentration von IL-6 gerade in den Ansätzen hoch ist, in denen es zu keiner ausgeprägten Makrophagen-/Schaumzellbildung kam, in denen aber auch andere Zytokine, die an Entzündungsreaktionen beteiligt sind, besonders hoch exprimiert waren. Gerade auch in der BMP4-Probe war die Konzentration von IL-6 besonders niedrig, während die Schaumzellentstehung höher als in den anderen Ansätzen war.

Der zweite hier ausgewertete Vertreter der Interleukine ist das IL-10. Synthetisiert wird es von diversen Zellen, vor allem aber von T-Zellen und Monozyten ¹⁵⁶. Im Gegensatz zu IL-6 zeichnet sich IL-10 primär durch anti-inflammatorische Wirkungen aus, die es durch Bindung an den IL-10 Rezeptor entfaltet, der daraufhin über Aktivierung von Tyrosinkinase komplexe Zellvorgänge einleitet. Diverse Studien haben die antiinflammatorische Wirkung von IL-10 nachgewiesen ¹⁵⁷⁻¹⁵⁸. Es hemmt unter anderem die Produktion von Entzündungsmediatoren wie IL-1 und IL-6 ¹⁵⁶, die Produktion von tissue factor ¹⁵⁹ und trägt bei hoher Expression zu einer Reduktion atherosklerotischer Läsionen bei ¹⁶⁰. Außerdem verhindert es durch seine anti-apoptotische Wirkung eine Progression der Bildung des necrotic core ¹⁶¹.

Die Konzentration von IL-10 in den Überständen der Proben, zu denen Gremlin-1 gegeben wurde, war um ein Vielfaches erhöht im Vergleich zu der im Medium und bei den BMP Proben.

3. Ergebnisse

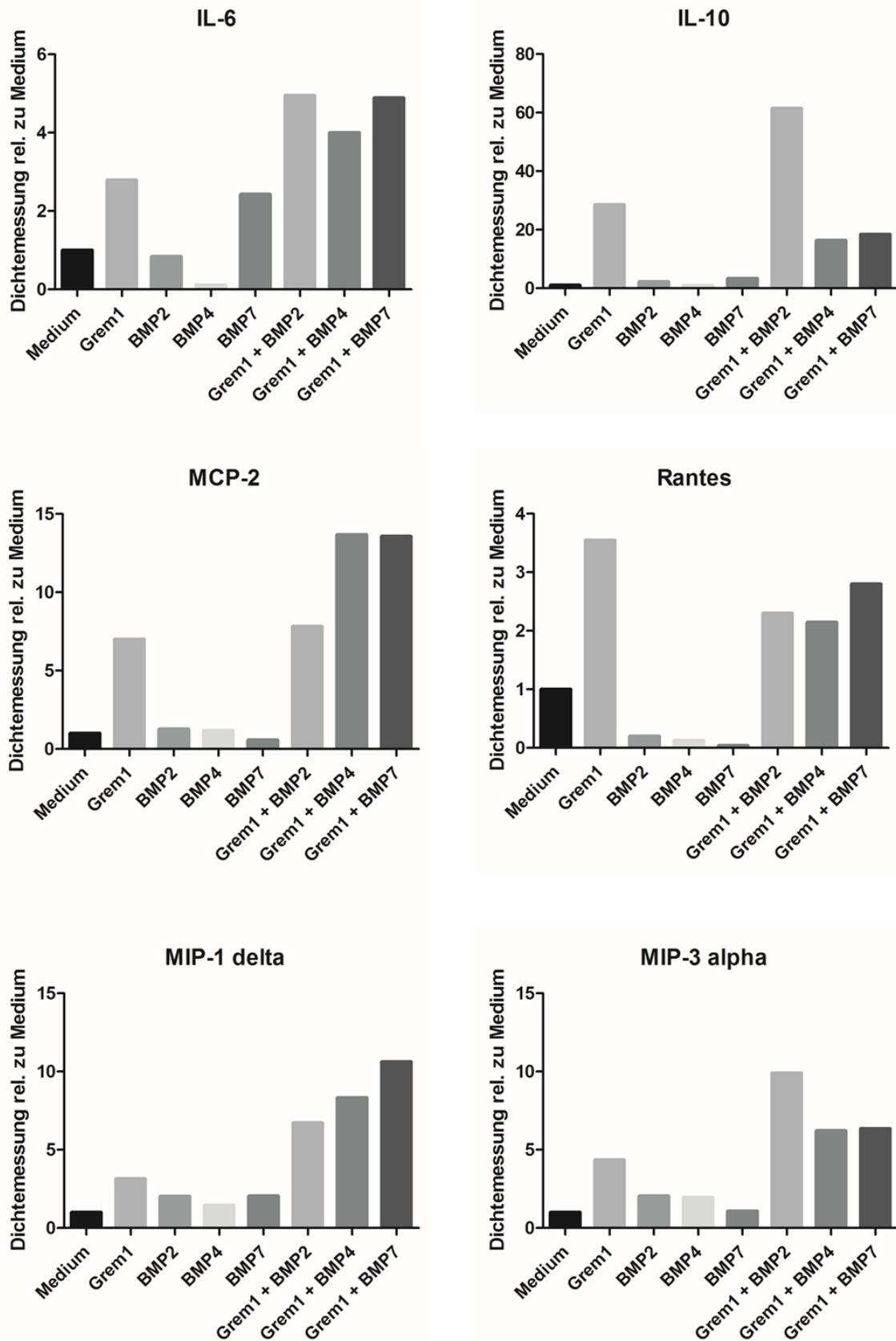


Abbildung 25: Zytokinexpression der verschiedenen Ansätze. Dargestellt sind Säulendiagramme der einzelnen Zytokine, wobei die einzelnen Werte immer relativ auf den Wert des Zytokins auf der Mediummembran angegeben sind

4. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der bone morphogenetic proteins 2, 4 und 7 auf die Differenzierung von humanen Monozyten *in vitro* zu Makrophagen und Schaumzellen zu untersuchen. Hierbei zeigte sich, dass die Entstehung von Makrophagen/Schaumzellen durch BMPs verstärkt wurde. Den stärksten Einfluss zeigte dabei BMP4, gefolgt von BMP7 und BMP2. Als Kontrolle dienten Ansätze, in die nur Zellkultur-Medium gegeben wurde, sowie als Positiv- bzw. Negativkontrolle Ansätze mit MIF und Gremlin-1.

4.1 Rolle der Schaumzellen und von MIF und Gremlin-1 im Rahmen der Atherosklerose

Die Entstehung von Schaumzellen stellt einen wichtigen Schritt in der Genese atherosklerotischer Veränderungen dar^{13, 17, 162}. Durch das Absterben dieser Schaumzellen gelangt zuvor intrazellulär gespeichertes LDL nach extrazellulär und akkumuliert in der Gefäßwand zu dem sogenannten „necrotic core“. Kommt es im Verlauf unter dem Einfluss von Metalloproteinasen zu einer Ruptur der fibrösen Kappe, die den necrotic core bedeckt, aggregieren Thrombozyten aufgrund von freigelegtem tissue factor und bilden einen Thrombus¹⁶³.

MIF trägt auf vielfältige Art und Weise zur Entstehung der Atherosklerose bei. Auf der einen Seite erhöht es die Expression chemotaktischer und pro-inflammatorischer Zytokine¹⁶⁴, auf der anderen Seite hat es auch einen direkten Einfluss auf die Monozyten-Differenzierung zu Makrophagen und Schaumzellen und somit auf die Entstehung und Entwicklung atherosklerotischer Läsionen¹⁶⁵.

Demgegenüber steht Gremlin-1, das durch direkte Bindung und anschließende Antagonisierung von MIF sowie MIF-unabhängigen Wirkungen der Schaumzellbildung und dem Progress der Atherosklerose entgegenwirkt^{109, 166-167}.

4. Diskussion

4.2 Einfluss von BMP 2, BMP4 und BMP7 auf die Entstehung von Makrophagen und Schaumzellen *in vitro*

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die untersuchten BMPs unterschiedliche Einflüsse auf die Differenzierung von Monozyten in der Interaktion mit Thrombozyten haben. Während man aufgrund der molekular sehr ähnlichen Strukturen von BMP2 und BMP4 an eine vergleichbare Wirkung hätte denken können, zeigte sich, dass BMP4 eine hoch signifikante ($p > 0,001$) Steigerung der Monozytendifferenzierung zu Makrophagen und Schaumzellen bewirkt, während sich nur ein geringer Effekt von BMP2 nachweisen ließ. Auch wenn erwiesenermaßen sowohl BMP2, als auch BMP4 eine Rolle bei der Atherogenese spielen, scheint in dem speziellen Teil der Makrophagen-/Schaumzellentstehung vor allem BMP4 fördernd zu wirken. Yao et al konnten an Mäusen zeigen, dass unter einer Fett- und Cholesterin-reichen Ernährung die Expression von BMP4 in atherosklerotischen Läsionen um das 3fache gesteigert war, während BMP2 im Vergleich zu den Mäusen, die normales Futter erhalten hatten, unverändert blieb⁷⁰. Auch die Ergebnisse von Dhore et al haben Unterschiede zwischen BMP2 und BMP4 dahingehend aufgezeigt, dass nur BMP4 von Makrophagen in der Umgebung des sogenannten „necrotic core“ in aortalen Plaques exprimiert wurde, ein Nachweis von BMP2 jedoch nicht gelang⁷¹. BMP2 scheint die Atherogenese eher durch eine verstärkte Gefäßwandkalzifizierung zu fördern^{117, 168}. Die vermehrte Makrophagen- und Schaumzellentstehung unter BMP4 Einfluss lässt darauf schließen, dass BMP4 auch an der Bildung von intramuralen Fettstreifen und an der Ausbildung des nekrotischen Bereichs unter der fibrösen Kappe beteiligt ist.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Monozytendifferenzierung zu Makrophagen und Schaumzellen auch unter dem Einfluss von BMP7. Da es aber durch BMP7 vor allem zur Entstehung von anti-inflammatorischen M2 Makrophagen kommt¹³³, konnte kürzlich in einer tierexperimentellen Studie gezeigt werden, dass unter Behandlung mit BMP7 eine verringerte Plaque-Bildung und Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine auftrat¹⁶⁹. BMP7 scheint demnach im Gegensatz zu BMP2 und BMP4 eher der Entwicklung und Progression atherosklerotischer Läsionen entgegen zu wirken, als sie zu befördern. Van Tits et al konnten jedoch zeigen, dass M2 Makrophagen durch ungehemmte Aufnahme von modifiziertem LDL (vor allem oxLDL) ihren Phänotyp und

4. Diskussion

damit einhergehend ihre Zytokinexpression hin zu einem eher entzündungsfördernden Phänotyp verändern. Zudem stellen sie einen Großteil der Makrophagen dar, die in Schaumzellen übergehen, und damit ebenso inflammatorische Prozesse antreiben ³⁹.

Es ist daher noch nicht abschließend geklärt, ob BMP7 auch dauerhaft die Atherogenese abschwächen kann, oder ob es eventuell im Verlauf durch erhöhte Makrophagendifferenzierung schlussendlich auch an der Progression dieser Läsionen mitwirkt. Ob also eine Behandlung mit BMP7 im Rahmen atherosklerotischer Veränderungen in Zukunft eine Rolle spielen wird, bleibt abzuwarten und muss weiter untersucht werden.

4.3 Einfluss der Interaktion von Gremlin-1 und BMPs auf die Entstehung von Makrophagen und Schaumzellen *in vitro*

Gremlin-1 ist bekanntermaßen ein Antagonist der BMPs, indem es diese direkt bindet und somit deren Bindung mit den Rezeptoren verhindert ^{100, 108, 170}. In den durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, dass durch Vorinkubation mit Gremlin-1 die Wirkung vor allem von BMP4 und BMP7 stark abgeschwächt wurde. Hierbei kam es jedoch nicht nur im Vergleich zu den Ansätzen ohne Gremlin-1 zu einer signifikanten Reduktion in der Bildung von Makrophagen und Schaumzellen, sondern auch verglichen mit der Mediumkontrolle. Einzig in der Kombination von Gremlin-1 und BMP4 waren keine Unterschiede zum Mediumansatz festzustellen. Interessanterweise scheint demnach die hemmende Wirkung von Gremlin-1 zu überwiegen, wobei sich dennoch die Unterschiede innerhalb der BMPs widerspiegeln. Eine mögliche Erklärung wäre, dass nicht an BMP gebundenes Gremlin-1 durch Bindung an andere Zytokine wie beispielweise MIF, von welchem erst kürzlich nachgewiesen werden konnte, dass es auch von Thrombozyten exprimiert wird ¹⁷¹, zusätzlich deren Wirkung vermindert hat und folglich insgesamt die Monozytendifferenzierung zu Makrophagen und Schaumzellen unter Gremlin-1 + BMP2 und BMP7 gehemmt wurde.

4.4 Einfluss der Interaktion von MIF, Gremlin-1 und BMPs auf die Entstehung von Makrophagen und Schaumzellen *in vitro*

Durch eine Vorinkubation von Gremlin-1 und MIF sollte untersucht werden, ob sich aufgrund der zu erwartenden gegenseitigen Antagonisierung dieser beiden Zytokine wieder die Wirkung der einzelnen BMPs herstellen lässt. Die Ergebnisse zeigten, dass es zu einer tendenziell gesteigerten Bildung von Makrophagen/Schaumzellen gegenüber der Negativ-Kontrolle mit Gremlin-1 kam, die Werte der Einzelansätze der BMPs aber nicht erreicht wurden. Es wurden vergleichbare Werte wie in der Medium-Kontrolle erreicht. Ein Einfluss von MIF war zwar insofern zu erkennen, als dass nicht, wie in den Vorversuchen ohne Gabe von MIF, signifikant weniger Monozyten-Differenzierungen zu beobachten waren, als in der Medium-Kontrolle, aber die hemmende Wirkung von Gremlin-1 auch nicht komplett antagonisiert werden konnte. Damit war eine partielle Antagonisierung möglich. Da für einen fördernden Effekt auf die Schaumzellentstehung schon eine niedrige Konzentration von MIF (10ng/ml) ausreicht, von Gremlin-1 aber deutlich höhere Konzentrationen benötigt werden (1µg/ml), wurden unterschiedliche Stoffmengen an MIF und Gremlin-1 vorinkubiert. Eine Anpassung der Stoffmenge auf gleiche Konzentrationen wäre nicht möglich gewesen, da diese Versuche dann mit den Vorexperimenten nicht vergleichbar gewesen wären. Durch die unterschiedlichen Konzentrationen der Zytokine konnte vermutlich viel bisher ungebundenes Gremlin-1 mit den im darauffolgenden Schritt zugegebenen BMPs interagieren, wodurch sich die nur partielle Antagonisierung erklären ließe. Der in den Voruntersuchungen gezeigte relativ gesehen stärkere hemmende Einfluss von Gremlin-1 auf die Differenzierung der Monozyten, als der fördernde der BMPs, wurde erst in der Kombination von MIF und BMPs größtenteils aufgehoben und auf das Niveau der Medium-Kontrolle gehoben.

4. Diskussion

4.5 Zytokinexpression von Makrophagen/Schaumzellen *in vitro*

Der Zytokin-Array konnte aufgrund des hohen Einkaufspreises nur einmal durchgeführt werden. Deshalb war eine statistische Auswertung des Zytokin Arrays aufgrund mangelnder Versuchsanzahl (n=1) nicht möglich, so dass die Ergebnisse der Auswertung der Membranen nur qualitativ beschrieben werden. Weitere Versuche könnten nachweisen, ob sich die beobachteten Auffälligkeiten bestätigen lassen. Die folgende Diskussion gibt daher einen möglichen Erklärungsansatz für das Zustandekommen dieser Ergebnisse, ohne dass deren Validität gesichert ist.

Insgesamt zeigte sich, dass sich die Expressionslevel der Zytokine weniger innerhalb der BMPs selbst unterscheiden, als viel stärker im Vergleich der BMPs mit Gremlin-1. Da Gremlin-1 als Antagonist von MIF fungiert, das mit einer erhöhten Expression einiger proinflammatorischer Zytokine assoziiert ist ⁴⁹, war anzunehmen, dass Gremlin-1 folglich zu einer Reduktion dieser Entzündungsmarker beiträgt.

Überraschenderweise zeigte es sich aber, dass es sowohl zu einer verringerten Konzentration von einigen entzündungsfördernden Zytokinen kam, als auch zu einer gesteigerten Expression proinflammatorisch wirkender Zytokine.

Während von MIF bekannt ist, dass es zu einer erhöhten Produktion von MCP-1 beispielsweise durch Endothelzellen führt ¹⁷², ist die Wirkung von Gremlin-1 diesbezüglich noch nicht nachgewiesen. Die Auswertung des Arrays ergab, dass es in dem Ansatz, in dem nur Gremlin-1 vorhanden war, tatsächlich auch zu einer erniedrigten Expression von MCP-1 kam, sich dieser Effekt in Kombination mit den BMPs jedoch nicht bestätigten ließ. In diesen Proben war die Konzentration von MCP-1 nur geringfügig anders, als in den Einzelansätzen mit BMPs. MCP-1 präsentiert sich sogar in der Kombination von Gremlin-1 und BMP7 geringgradig erhöht, die beide alleine zu einer verringerten Ausschüttung von MCP-1 führen.

Ähnlich wie mit MCP-1 verhält es sich mit NAP-2. Auch hier scheint eine hemmende Wirkung von Gremlin-1 auf das chemotaktische Zytokin NAP-2 vorzuliegen. Diese hemmende Wirkung lässt sich sowohl in dem Einzelansatz mit Gremlin-1, als auch im Vergleich der Ansätze mit BMP2 und BMP4 jeweils mit und ohne Gremlin-1 Zugabe, nachweisen. In diesen führte die Zugabe von Gremlin-1 zu einer deutlich verminderten Expression von NAP-2.

4. Diskussion

Auf der anderen Seite wurden unter Gremlin-1 Zytokine hochreguliert, die maßgeblich an der Aufrechterhaltung einer Entzündungsreaktion beteiligt sind. Dazu zählt unter anderem das Interleukin 6, dessen Expression mit Gremlin-1 in bestimmten pathologischen Vorgängen positiv korreliert, was kürzlich bereits nachgewiesen wurde¹⁷³⁻¹⁷⁴. In diesen Studien zeigte sich ein Zusammenwirken von IL-6 und Gremlin-1 im Rahmen fibrotischer bzw. hyperplastischer Gewebsveränderungen. Es ist bekannt und bestätigte sich auch in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten, dass Gremlin-1 durch Inhibition von MIF die Entstehung von Schaumzellen hemmt, ein Prozess, der für die Atherogenese sehr wichtig ist. Wie Persson et al in *in vitro* Studien gezeigt haben, hemmen lipidgefüllte Makrophagen die Expression von IL-6¹⁷⁵. Dies konnte auch in den Ergebnissen dieser Arbeit bestätigt werden, da es unter Gremlin-1 Einfluss zu einer geringeren Schaumzellbildung kam und hier die Expression von IL-6 erhöht wurde. Weiterhin ist auch eine Erhöhung der Expression von IL-10 unter Gremlin-1 Zugabe festzustellen, das durch seine primär anti-inflammatorische Wirkung eine Art Gegenspieler von IL-6 darstellt. Diese Erhöhung ist relativ gesehen noch deutlich stärker als die von IL-6, wenn man die Ansätze mit und ohne Gremlin-1 vergleicht. Ähnlich wie bei IL-6 verhält es sich mit Rantes. Von Rantes ist wie von Gremlin-1 bekannt, dass es eine Rolle bei Entwicklung einer Leberfibrose spielt^{97, 176}, wohingegen es bei der Atherosklerose durch seine stark chemotaktische Wirkung vor allem Monozyten und T-Zellen anzieht und dadurch zu einer Progression der Erkrankung führt¹⁶⁴. Die Höhe der Rantes Expression war bei den BMPs deutlich verringert und auch in den Kombinationsansätzen zumindest im Vergleich zur reinen Gremlin-1 Probe abgeschwächt. Die Funktion der zusätzlich hochregulierten MIP-1 delta, MIP-3 alpha und MCP-2 ist vergleichbar mit Rantes primär in der Anlockung weißer Blutzellen zu sehen.

Insgesamt waren demnach einige proinflammatorisch wirkende Zytokine in den mit Gremlin-1 versetzten Proben deutlich stärker konzentriert vorhanden, als in den anderen Ansätzen, andererseits aber auch beispielsweise IL-10 mit entgegengesetzten Wirkungen. Gremlin-1 scheint also eine komplexe und teils gegensätzliche Wirkung auf die Zytokinexpression von Monozyten/Makrophagen zu haben.

4. Diskussion

Es muss aber auch in Betracht gezogen werden, dass es in diesen Ansätzen mit Gremlin-1 durch verstärkten Zelluntergang zu einer erhöhten Zytokinfreisetzung in den extrazellulären Kulturüberstand gekommen ist. Wie in den Graphen über den Verlauf der Zellzahlen dargelegt wurde, kam es unter Gremlin-1 Einfluss bis zu Tag 14 zu einem Rückgang der Anzahl an Makrophagen/Schaumzellen, wohingegen in den anderen Ansätzen die Zellzahl entweder konstant blieb oder sogar gestiegen ist.

Zudem konzentriert sich die Zytokinfreisetzung *in vivo* im Rahmen der Atherogenese nicht nur auf Monozyten/Makrophagen und Thrombozyten, sondern betrifft auch andere Zellen wie Leukozyten und Endothelzellen, die an der Regulierung der Zytokine maßgeblich beteiligt sind.

Eine abschließende Beurteilung der Zytokinexpression unter BMP- und Gremlin-1-Einfluss kann anhand dieser Arbeit nicht vorgenommen werden. Mit weiterführenden Experimente könnte dieser Fragestellung nachgegangen werden, unter anderem auch, um eine mögliche klinische Relevanz zu überprüfen.

4.6 Limitationen der Arbeit

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit beruhen ausschließlich auf *in vitro* durchgeführten Experimenten und sind nicht ohne weiteres auf Prozesse *in vivo* übertragbar. Zudem wurde der Einfluss der BMPs selektiv auf eine Unterart der Leukozyten untersucht, ohne auf Interaktionen mit weiteren Zelltypen einzugehen. Inwiefern sich die beobachteten *in vitro* Effekte bei den pathophysiologisch komplexen Abläufen im Rahmen der Atherogenese widerspiegeln, lässt sich anhand dieser Arbeit nicht beurteilen. Weiterhin wurde auf zellulärer Ebene nicht zwischen den verschiedenen Typen von Makrophagen unterschieden, deren Aufgaben und Funktionen mitunter sehr gegensätzlich sind. Folglich lässt sich von einer gesteigerten Entstehung von Makrophagen oder Schaumzellen aus Monozyten unter dem Einfluss von BMPs nicht direkt auf einen fördernden Effekt atherosklerotischer Veränderungen schließen.

Die Ergebnisse des Zytokin-Array sind, wie bereits erwähnt, aufgrund der nur einmaligen Durchführung statistisch nicht zu testen und können allenfalls zur Aufstellung von neuen Hypothesen des Effekts von BMPs und Gremlin-1 auf Monozyten, Makrophagen und Schaumzellen herangezogen werden.

4.7 Schlussfolgerung

In den durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass BMP4 und BMP7 einen hochsignifikanten Einfluss auf die *in vitro* Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen und Schaumzellen haben, wohingegen BMP2 in diesem Versuchsansatz nur einen geringen, insgesamt statistisch nicht signifikanten Effekt aufwies. So konnte unter BMP4 und BMP7 die Makrophagen- und Schaumzellentstehung deutlich im Vergleich zur Medium-Kontrolle gesteigert werden, vergleichbar mit dem Effekt, den das proatherogene und proentzündliche Zytokin MIF auf diesen Vorgang hat. Werden die untersuchten BMPs jedoch mit einem ihrer Antagonisten, Gremlin-1, kombiniert, so wird ihre Wirkung nicht nur abgeschwächt, sondern sogar in Richtung einer Hemmung der Differenzierung umgekehrt.

Zukünftige *in vivo* Experimente müssen zeigen, ob sich diese Ergebnisse bestätigen lassen. So könnte eine Bestimmung von BMP-Konzentrationen im klinischen Alltag, vor allem von BMP 2 und 4, deren Beteiligung an der Atherogenese belegt ist¹⁷⁷⁻¹⁷⁸, dazu beitragen, das Risiko der Entstehung und Progression der Atherosklerose in Patienten zu evaluieren. Atherosklerotische Läsionen könnten durch den gezielten Einsatz von BMP-Proteinen oder deren Antikörpern in ihrer Entstehung und Progression gehemmt werden. So würden sich neue kausal therapeutische Ansätze zur Behandlung der Atherosklerose ergeben.

5. Zusammenfassung

Die Atherosklerose bzw. deren klinische Manifestationen sind entscheidend an diversen Krankheiten des Herz-Kreislauf-Systems beteiligt. Der Einfluss der BMPs auf die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen bzw. Schaumzellen im Rahmen atherosklerotischer Prozesse ist ein bisher nur wenig erforschtes Thema. In dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, inwiefern sich *in vitro* ein Einfluss der BMPs auf diese Differenzierungsprozesse nachweisen lässt und welche Unterschiede zwischen den einzelnen Proteinen dieser Familie zu beobachten sind.

Hierfür wurden Zellkulturen angelegt, die sich aus humanen Monozyten und humanen Thrombozyten zusammensetzten. In unterschiedlichen Ansätzen wurde daraufhin der Effekt verschiedener BMPs (BMP2, BMP4, BMP7) auf die quantitative Entstehung von Schaumzellen aus den kultivierten Monozyten untersucht. Dabei zeigte sich, dass vor allem BMP4 und BMP7 diese Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen und Schaumzellen verstärkten. Von BMP2 war dieser Effekt in den durchgeführten *in vitro* Versuchen insgesamt nicht nachweisbar. In weiterführenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass sich die beobachteten Effekte der vermehrten Differenzierung der Monozyten unter BMP4- und BMP7-Einfluss durch Antagonisierung dieser BMPs mit Hilfe von Gremlin-1 aufheben ließen.

Somit konnte *in vitro* ein Effekt von BMP4 und BMP7 auf die Entstehung von Schaumzellen nachgewiesen werden. Es bleibt zu klären, ob sich diese Ergebnisse in *in vivo* Experimenten reproduzieren und somit bestätigen lassen. Abhängig davon könnten sich beispielsweise durch Screening-Maßnahmen wie Serumspiegelbestimmungen von BMPs neue Präventions- und Therapieoptionen bieten, um die Entstehung bzw. die Folgen atherosklerotischer Veränderungen zu reduzieren.

6. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Ablauf der Atherosklerose.....	5
Abbildung 2: Funktionsweise der Signaltransduktion von der extrazellulären Bindung von BMP bis zur Transkription von Genen im Zellkern.....	13
Abbildung 3: Ausbleiben der Frakturheilung ohne BMP2.....	17
Abbildung 4: Strukturelle Darstellung eines BMP7 Monomers (A) und eines BMP7 Dimers, gebunden an 2 Typ II Rezeptoren (B).....	20
Abbildung 5: Anordnung der verschiedenen Ansätze in den einzelnen Wells der Zellkulturplatten.....	30
Abbildung 6: Anordnung der verschiedenen Ansätze in den einzelnen Wells der Zellkulturplatten.....	33
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Funktionsweise des Zytokin Array.....	35
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Anlegens von Monozyten-Monokultur (Variante 1) und Monozyten-Thrombozyten-Kokultur (Variante 2).....	39
Abbildung 9: Vergleichende Darstellung von Mono- und Kokultur.....	40
Abbildung 10: Bilder einer Zellkultur in verschiedenen Vergrößerungen.....	41
Abbildung 11: Entwicklung der Zellkulturen unter Einfluss der BMPs.....	42
Abbildung 12: Einfluss der BMP-Einzelansätze auf die Entstehung von Makrophagen/Schaumzellen.....	44
Abbildung 13: Vergleich der Entwicklung der Zellkulturen unter Kombination von Grem1 und BMPs mit Einzelansätzen.....	45
Abbildung 14: Einfluss der Zugabe von Grem1 zu den BMPs.....	47
Abbildung 15: Einfluss der Zugabe von Grem1 zu den BMPs.....	48
Abbildung 16: Vergleich der Entwicklung der Zellkulturen unter 3-fach Kombination der BMPs mit MIF und Grem1.....	49
Abbildung 17: Einfluss der Gabe von MIF und Grem1 zu den BMPs.....	51
Abbildung 18: Makrophagen-/Schaumzellentstehung an Tag 8.....	52
Abbildung 19: Makrophagen-/Schaumzellentstehung an Tag 11.....	52
Abbildung 20: Makrophagen-/Schaumzellentstehung an Tag 14..	53
Abbildung 21: Makrophagen-/Schaumzellentstehung über alle Tage.....	53
Abbildung 22: Darstellung der mit einer Chemilumineszenzkamera erstellten Bilder der Membranen des Zytokin Arrays.....	54

6. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 23: Darstellung einer Membran des Zytokin-Arrays durch eine Chemilumineszenz-Kamera.....	55
Abbildung 24: Zytokinexpression der verschiedenen Ansätze.....	57
Abbildung 25: Zytokinexpression der verschiedenen Ansätze.....	60
Tabelle 1: Mittelwerte der Kulturen der ersten Versuchsreihe mit n=3.....	43
Tabelle 2: Mittelwerte der Kulturen der zweiten Versuchsreihe mit n=4.....	46
Tabelle 3: Mittelwerte der Kulturen der dritten Versuchsreihe mit n=5.....	50

7. Literaturverzeichnis

1. Hansson, G. K.; Hermansson, A., The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol* **2011**, *12* (3), 204-12.
2. Lusis, A. J., Atherosclerosis. *Nature* **2000**, *407* (6801), 233-41.
3. Gimbrone, M. A., Jr., Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherosclerosis. *Thromb Haemost* **1999**, *82* (2), 722-6.
4. Prado, C. M.; Ramos, S. G.; Elias, J., Jr.; Rossi, M. A., Turbulent blood flow plays an essential localizing role in the development of atherosclerotic lesions in experimentally induced hypercholesterolaemia in rats. *Int J Exp Pathol* **2008**, *89* (1), 72-80.
5. Falk, E., Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* **2006**, *47* (8 Suppl), C7-12.
6. Ross, R., Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* **1999**, *340* (2), 115-26.
7. Wiesner, P.; Tafelmeier, M.; Chittka, D.; Choi, S. H.; Zhang, L.; Byun, Y. S.; Almazan, F.; Yang, X.; Iqbal, N.; Chowdhury, P.; Maisel, A.; Witztum, J. L.; Handel, T. M.; Tsimikas, S.; Miller, Y. I., MCP-1 binds to oxidized LDL and is carried by lipoprotein(a) in human plasma. *J Lipid Res* **2013**, *54* (7), 1877-83.
8. Rajavashisth, T. B.; Andalibi, A.; Territo, M. C.; Berliner, J. A.; Navab, M.; Fogelman, A. M.; Lusis, A. J., Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature* **1990**, *344* (6263), 254-7.
9. Geisler, T.; Bhatt, D. L., The role of inflammation in atherothrombosis: current and future strategies of medical treatment. *Med Sci Monit* **2004**, *10* (12), RA308-16.
10. Steinberg, D., Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* **1997**, *272* (34), 20963-6.
11. Steinberg, D., Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nat Med* **2002**, *8* (11), 1211-7.
12. Young, I. S.; McEneny, J., Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans* **2001**, *29* (Pt 2), 358-62.
13. Weber, C.; Noels, H., Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med* **2011**, *17* (11), 1410-22.
14. Libby, P.; Ridker, P. M.; Hansson, G. K., Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* **2011**, *473* (7347), 317-25.
15. Uzui, H.; Harpf, A.; Liu, M.; Doherty, T. M.; Shukla, A.; Chai, N. N.; Tripathi, P. V.; Jovinge, S.; Wilkin, D. J.; Asotra, K.; Shah, P. K.; Rajavashisth, T. B., Increased expression of membrane type 3-matrix metalloproteinase in human atherosclerotic plaque: role of activated macrophages and inflammatory cytokines. *Circulation* **2002**, *106* (24), 3024-30.
16. Galis, Z. S.; Sukhova, G. K.; Lark, M. W.; Libby, P., Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* **1994**, *94* (6), 2493-503.
17. Tabas, I., Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat Rev Immunol* **2010**, *10* (1), 36-46.
18. Mantovani, A.; Garlanda, C.; Locati, M., Macrophage diversity and polarization in atherosclerosis: a question of balance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2009**, *29* (10), 1419-23.
19. Galkina, E.; Ley, K., Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2007**, *27* (11), 2292-301.

7. Literaturverzeichnis

20. Mestas, J.; Ley, K., Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* **2008**, *18* (6), 228-32.
21. Bobryshev, Y. V., Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis. *Micron* **2006**, *37* (3), 208-22.
22. Gui, T.; Shimokado, A.; Sun, Y.; Akasaka, T.; Muragaki, Y., Diverse roles of macrophages in atherosclerosis: from inflammatory biology to biomarker discovery. *Mediators Inflamm* **2012**, *2012*, 693083.
23. Mosser, D. M.; Edwards, J. P., Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* **2008**, *8* (12), 958-69.
24. Kadl, A.; Meher, A. K.; Sharma, P. R.; Lee, M. Y.; Doran, A. C.; Johnstone, S. R.; Elliott, M. R.; Gruber, F.; Han, J.; Chen, W.; Kensler, T.; Ravichandran, K. S.; Isakson, B. E.; Wamhoff, B. R.; Leitinger, N., Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via Nrf2. *Circ Res* **2010**, *107* (6), 737-46.
25. Galkina, E.; Ley, K., Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (*). *Annu Rev Immunol* **2009**, *27*, 165-97.
26. Bouhrel, M. A.; Derudas, B.; Rigamonti, E.; Dievart, R.; Brozek, J.; Haulon, S.; Zawadzki, C.; Jude, B.; Torpier, G.; Marx, N.; Staels, B.; Chinetti-Gbaguidi, G., PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab* **2007**, *6* (2), 137-43.
27. Porcheray, F.; Viaud, S.; Rimaniol, A. C.; Leone, C.; Samah, B.; Dereuddre-Bosquet, N.; Dormont, D.; Gras, G., Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin Exp Immunol* **2005**, *142* (3), 481-9.
28. Sica, A.; Mantovani, A., Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* **2012**, *122* (3), 787-95.
29. Qian, B. Z.; Pollard, J. W., Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* **2010**, *141* (1), 39-51.
30. Arnold, C. E.; Whyte, C. S.; Gordon, P.; Barker, R. N.; Rees, A. J.; Wilson, H. M., A critical role for suppressor of cytokine signalling 3 in promoting M1 macrophage activation and function in vitro and in vivo. *Immunology* **2014**, *141* (1), 96-110.
31. Gordon, S., Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* **2003**, *3* (1), 23-35.
32. Johnson, J. L.; Newby, A. C., Macrophage heterogeneity in atherosclerotic plaques. *Curr Opin Lipidol* **2009**, *20* (5), 370-8.
33. Quinn, M. T.; Parthasarathy, S.; Fong, L. G.; Steinberg, D., Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1987**, *84* (9), 2995-8.
34. Buechler, C.; Ritter, M.; Orso, E.; Langmann, T.; Klucken, J.; Schmitz, G., Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J Leukoc Biol* **2000**, *67* (1), 97-103.
35. Hulsmans, M.; Holvoet, P., The vicious circle between oxidative stress and inflammation in atherosclerosis. *J Cell Mol Med* **2010**, *14* (1-2), 70-8.
36. Kzhyshkowska, J.; Neyer, C.; Gordon, S., Role of macrophage scavenger receptors in atherosclerosis. *Immunobiology* **2012**, *217* (5), 492-502.
37. Xia, F.; Li, R.; Wang, C.; Yang, S.; Tian, L.; Dong, H.; Pei, C.; He, S.; Jiang, P.; Cheng, H.; Fang, S.; Li, H.; Xu, H., IRGM1 regulates oxidized LDL uptake by macrophage via actin-dependent receptor internalization during atherosclerosis. *Sci Rep* **2013**, *3*, 1867.

7. Literaturverzeichnis

38. Zizzo, G.; Hilliard, B. A.; Monestier, M.; Cohen, P. L., Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires M2c polarization and MerTK induction. *J Immunol* **2012**, *189* (7), 3508-20.
39. van Tits, L. J.; Stienstra, R.; van Lent, P. L.; Netea, M. G.; Joosten, L. A.; Stalenhoef, A. F., Oxidized LDL enhances pro-inflammatory responses of alternatively activated M2 macrophages: a crucial role for Kruppel-like factor 2. *Atherosclerosis* **2011**, *214* (2), 345-9.
40. Oh, J.; Riek, A. E.; Weng, S.; Petty, M.; Kim, D.; Colonna, M.; Cella, M.; Bernal-Mizrachi, C., Endoplasmic reticulum stress controls M2 macrophage differentiation and foam cell formation. *J Biol Chem* **2012**, *287* (15), 11629-41.
41. Canton, J.; Neculai, D.; Grinstein, S., Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat Rev Immunol* **2013**, *13* (9), 621-34.
42. Kuchibhotla, S.; Vanegas, D.; Kennedy, D. J.; Guy, E.; Nimako, G.; Morton, R. E.; Febbraio, M., Absence of CD36 protects against atherosclerosis in ApoE knock-out mice with no additional protection provided by absence of scavenger receptor A I/II. *Cardiovasc Res* **2008**, *78* (1), 185-96.
43. Mineo, C.; Shaul, P. W., Functions of scavenger receptor class B, type I in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* **2012**, *23* (5), 487-93.
44. Liu, J.; Huan, C.; Chakraborty, M.; Zhang, H.; Lu, D.; Kuo, M. S.; Cao, G.; Jiang, X. C., Macrophage sphingomyelin synthase 2 deficiency decreases atherosclerosis in mice. *Circ Res* **2009**, *105* (3), 295-303.
45. Yvan-Charvet, L.; Ranalletta, M.; Wang, N.; Han, S.; Terasaka, N.; Li, R.; Welch, C.; Tall, A. R., Combined deficiency of ABCA1 and ABCG1 promotes foam cell accumulation and accelerates atherosclerosis in mice. *J Clin Invest* **2007**, *117* (12), 3900-8.
46. Zerneck, A.; Bernhagen, J.; Weber, C., Macrophage migration inhibitory factor in cardiovascular disease. *Circulation* **2008**, *117* (12), 1594-602.
47. Calandra, T.; Roger, T., Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol* **2003**, *3* (10), 791-800.
48. Schmeisser, A.; Marquetant, R.; Illmer, T.; Graffy, C.; Garlich, C. D.; Bockler, D.; Menschikowski, D.; Braun-Dullaeus, R.; Daniel, W. G.; Strasser, R. H., The expression of macrophage migration inhibitory factor 1alpha (MIF 1alpha) in human atherosclerotic plaques is induced by different proatherogenic stimuli and associated with plaque instability. *Atherosclerosis* **2005**, *178* (1), 83-94.
49. Muller, II; Muller, K. A.; Schonleber, H.; Karathanos, A.; Schneider, M.; Jorbenadze, R.; Bigalke, B.; Gawaz, M.; Geisler, T., Macrophage migration inhibitory factor is enhanced in acute coronary syndromes and is associated with the inflammatory response. *PLoS One* **2012**, *7* (6), e38376.
50. Pan, J. H.; Sukhova, G. K.; Yang, J. T.; Wang, B.; Xie, T.; Fu, H.; Zhang, Y.; Satoskar, A. R.; David, J. R.; Metz, C. N.; Bucala, R.; Fang, K.; Simon, D. I.; Chapman, H. A.; Libby, P.; Shi, G. P., Macrophage migration inhibitory factor deficiency impairs atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* **2004**, *109* (25), 3149-53.
51. Schober, A.; Bernhagen, J.; Thiele, M.; Zeiffer, U.; Knarren, S.; Roller, M.; Bucala, R.; Weber, C., Stabilization of atherosclerotic plaques by blockade of macrophage migration inhibitory factor after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* **2004**, *109* (3), 380-5.
52. Mitchell, R. A.; Liao, H.; Chesney, J.; Fingerle-Rowson, G.; Baugh, J.; David, J.; Bucala, R., Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99* (1), 345-50.

7. Literaturverzeichnis

53. Kleemann, R.; Zadelaar, S.; Kooistra, T., Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc Res* **2008**, *79* (3), 360-76.
54. Urist, M. R., Bone: formation by autoinduction. *Science* **1965**, *150* (3698), 893-9.
55. Chen, D.; Zhao, M.; Mundy, G. R., Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* **2004**, *22* (4), 233-41.
56. Chang, K.; Weiss, D.; Suo, J.; Vega, J. D.; Giddens, D.; Taylor, W. R.; Jo, H., Bone morphogenetic protein antagonists are coexpressed with bone morphogenetic protein 4 in endothelial cells exposed to unstable flow in vitro in mouse aortas and in human coronary arteries: role of bone morphogenetic protein antagonists in inflammation and atherosclerosis. *Circulation* **2007**, *116* (11), 1258-66.
57. Hogan, B. L., Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* **1996**, *10* (13), 1580-94.
58. Oryan, A.; Alidadi, S.; Moshiri, A.; Bigham-Sadegh, A., Bone morphogenetic proteins: a powerful osteoinductive compound with non-negligible side effects and limitations. *Biofactors* **2014**, *40* (5), 459-81.
59. Miyazono, K.; Kamiya, Y.; Morikawa, M., Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem* **2010**, *147* (1), 35-51.
60. Bragdon, B.; Moseychuk, O.; Saldanha, S.; King, D.; Julian, J.; Nohe, A., Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cell Signal* **2011**, *23* (4), 609-20.
61. Carreira, A. C.; Alves, G. G.; Zambuzzi, W. F.; Sogayar, M. C.; Granjeiro, J. M., Bone Morphogenetic Proteins: structure, biological function and therapeutic applications. *Arch Biochem Biophys* **2014**, *561*, 64-73.
62. Xiao, Y. T.; Xiang, L. X.; Shao, J. Z., Bone morphogenetic protein. *Biochem Biophys Res Commun* **2007**, *362* (3), 550-3.
63. Griffith, D. L.; Keck, P. C.; Sampath, T. K.; Rueger, D. C.; Carlson, W. D., Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: structural paradigm for the transforming growth factor beta superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, *93* (2), 878-83.
64. Yamamoto, Y.; Oelgeschlager, M., Regulation of bone morphogenetic proteins in early embryonic development. *Naturwissenschaften* **2004**, *91* (11), 519-34.
65. Warner, J. F.; Lyons, D. C.; McClay, D. R., Left-right asymmetry in the sea urchin embryo: BMP and the asymmetrical origins of the adult. *PLoS Biol* **2012**, *10* (10), e1001404.
66. Wang, R. N.; Green, J.; Wang, Z.; Deng, Y.; Qiao, M.; Peabody, M.; Zhang, Q.; Ye, J.; Yan, Z.; Denduluri, S.; Idowu, O.; Li, M.; Shen, C.; Hu, A.; Haydon, R. C.; Kang, R.; Mok, J.; Lee, M. J.; Luu, H. L.; Shi, L. L., Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes Dis* **2014**, *1* (1), 87-105.
67. Johnson, R. C.; Leopold, J. A.; Loscalzo, J., Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circ Res* **2006**, *99* (10), 1044-59.
68. Wagner, D. O.; Sieber, C.; Bhushan, R.; Borgermann, J. H.; Graf, D.; Knaus, P., BMPs: from bone to body morphogenetic proteins. *Sci Signal* **2010**, *3* (107), mr1.
69. McCormack, N.; O'Dea, S., Regulation of epithelial to mesenchymal transition by bone morphogenetic proteins. *Cell Signal* **2013**, *25* (12), 2856-62.
70. Yao, Y.; Bennett, B. J.; Wang, X.; Rosenfeld, M. E.; Giachelli, C.; Lusis, A. J.; Bostrom, K. I., Inhibition of bone morphogenetic proteins protects against atherosclerosis and vascular calcification. *Circ Res* **2010**, *107* (4), 485-94.
71. Dhore, C. R.; Cleutjens, J. P.; Lutgens, E.; Cleutjens, K. B.; Geusens, P. P.; Kitslaar, P. J.; Tordoir, J. H.; Spronk, H. M.; Vermeer, C.; Daemen, M. J., Differential

7. Literaturverzeichnis

- expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2001**, 21 (12), 1998-2003.
72. Derwall, M.; Malhotra, R.; Lai, C. S.; Beppu, Y.; Aikawa, E.; Seehra, J. S.; Zapol, W. M.; Bloch, K. D.; Yu, P. B., Inhibition of bone morphogenetic protein signaling reduces vascular calcification and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2012**, 32 (3), 613-22.
73. Kawabata, M.; Imamura, T.; Miyazono, K., Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* **1998**, 9 (1), 49-61.
74. Liu, A.; Niswander, L. A., Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development. *Nat Rev Neurosci* **2005**, 6 (12), 945-54.
75. Yu, P. B.; Beppu, H.; Kawai, N.; Li, E.; Bloch, K. D., Bone morphogenetic protein (BMP) type II receptor deletion reveals BMP ligand-specific gain of signaling in pulmonary artery smooth muscle cells. *J Biol Chem* **2005**, 280 (26), 24443-50.
76. Li, L.; Lin, M.; Wang, Y.; Cserjesi, P.; Chen, Z.; Chen, Y., Bmpr1a is required in mesenchymal tissue and has limited redundant function with Bmpr1b in tooth and palate development. *Developmental biology* **2011**, 349 (2), 451-461.
77. ten Dijke, P.; Yamashita, H.; Sampath, T. K.; Reddi, A. H.; Estevez, M.; Riddle, D. L.; Ichijo, H.; Heldin, C. H.; Miyazono, K., Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J Biol Chem* **1994**, 269 (25), 16985-8.
78. Greenwald, J.; Groppe, J.; Gray, P.; Wiater, E.; Kwiatkowski, W.; Vale, W.; Choe, S., The BMP7/ActRII extracellular domain complex provides new insights into the cooperative nature of receptor assembly. *Mol Cell* **2003**, 11 (3), 605-17.
79. Heldin, C. H.; Miyazono, K.; ten Dijke, P., TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* **1997**, 390 (6659), 465-71.
80. Hruska, K. A.; Mathew, S.; Saab, G., Bone morphogenetic proteins in vascular calcification. *Circ Res* **2005**, 97 (2), 105-14.
81. Goumans, M. J.; Mummery, C., Functional analysis of the TGFbeta receptor/Smad pathway through gene ablation in mice. *Int J Dev Biol* **2000**, 44 (3), 253-65.
82. Derynck, R.; Zhang, Y. E., Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* **2003**, 425 (6958), 577-84.
83. Zhang, Y. E., Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res* **2009**, 19 (1), 128-39.
84. Miyazono, K., Signal transduction by bone morphogenetic protein receptors: functional roles of Smad proteins. *Bone* **1999**, 25 (1), 91-3.
85. Hata, A.; Lagna, G.; Massague, J.; Hemmati-Brivanlou, A., Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev* **1998**, 12 (2), 186-97.
86. Nakao, A.; Afrakhte, M.; Moren, A.; Nakayama, T.; Christian, J. L.; Heuchel, R.; Itoh, S.; Kawabata, M.; Heldin, N. E.; Heldin, C. H.; ten Dijke, P., Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature* **1997**, 389 (6651), 631-5.
87. Canalis, E.; Economides, A. N.; Gazzerro, E., Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev* **2003**, 24 (2), 218-35.
88. Onichtchouk, D.; Chen, Y. G.; Dosch, R.; Gawantka, V.; Delius, H.; Massague, J.; Niehrs, C., Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* **1999**, 401 (6752), 480-5.
89. Carreira, A. C.; Lojudice, F. H.; Halcsik, E.; Navarro, R. D.; Sogayar, M. C.; Granjeiro, J. M., Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives. *J Dent Res* **2014**, 93 (4), 335-45.

7. Literaturverzeichnis

90. Ali, I. H.; Brazil, D. P., Bone morphogenetic proteins and their antagonists: current and emerging clinical uses. *Br J Pharmacol* **2014**, *171* (15), 3620-32.
91. Walsh, D. W.; Godson, C.; Brazil, D. P.; Martin, F., Extracellular BMP-antagonist regulation in development and disease: tied up in knots. *Trends Cell Biol* **2010**, *20* (5), 244-56.
92. Rider, C. C.; Mulloy, B., Bone morphogenetic protein and growth differentiation factor cytokine families and their protein antagonists. *Biochem J* **2010**, *429* (1), 1-12.
93. Kattamuri, C.; Luedeke, D. M.; Nolan, K.; Rankin, S. A.; Greis, K. D.; Zorn, A. M.; Thompson, T. B., Members of the DAN family are BMP antagonists that form highly stable noncovalent dimers. *J Mol Biol* **2012**, *424* (5), 313-27.
94. Avsian-Kretchmer, O.; Hsueh, A. J., Comparative genomic analysis of the eight-membered ring cystine knot-containing bone morphogenetic protein antagonists. *Mol Endocrinol* **2004**, *18* (1), 1-12.
95. Wu, X. B.; Li, Y.; Schneider, A.; Yu, W.; Rajendren, G.; Iqbal, J.; Yamamoto, M.; Alam, M.; Brunet, L. J.; Blair, H. C.; Zaidi, M.; Abe, E., Impaired osteoblastic differentiation, reduced bone formation, and severe osteoporosis in noggin-overexpressing mice. *J Clin Invest* **2003**, *112* (6), 924-34.
96. Gazzero, E.; Gangji, V.; Canalis, E., Bone morphogenetic proteins induce the expression of noggin, which limits their activity in cultured rat osteoblasts. *J Clin Invest* **1998**, *102* (12), 2106-14.
97. Boers, W.; Aarass, S.; Linthorst, C.; Pinzani, M.; Elferink, R. O.; Bosma, P., Transcriptional profiling reveals novel markers of liver fibrogenesis: gremlin and insulin-like growth factor-binding proteins. *J Biol Chem* **2006**, *281* (24), 16289-95.
98. Moreno-Miralles, I.; Schisler, J. C.; Patterson, C., New insights into bone morphogenetic protein signaling: focus on angiogenesis. *Curr Opin Hematol* **2009**, *16* (3), 195-201.
99. Rothhammer, T.; Poser, I.; Soncin, F.; Bataille, F.; Moser, M.; Bosserhoff, A. K., Bone morphogenetic proteins are overexpressed in malignant melanoma and promote cell invasion and migration. *Cancer Res* **2005**, *65* (2), 448-56.
100. Koli, K.; Myllarniemi, M.; Vuorinen, K.; Salmenkivi, K.; Ryyanen, M. J.; Kinnula, V. L.; Keski-Oja, J., Bone morphogenetic protein-4 inhibitor gremlin is overexpressed in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* **2006**, *169* (1), 61-71.
101. Dolan, V.; Murphy, M.; Sadlier, D.; Lappin, D.; Doran, P.; Godson, C.; Martin, F.; O'Meara, Y.; Schmid, H.; Henger, A.; Kretzler, M.; Droguett, A.; Mezzano, S.; Brady, H. R., Expression of gremlin, a bone morphogenetic protein antagonist, in human diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis* **2005**, *45* (6), 1034-9.
102. Roxburgh, S. A.; Murphy, M.; Pollock, C. A.; Brazil, D. P., Recapitulation of embryological programmes in renal fibrosis--the importance of epithelial cell plasticity and developmental genes. *Nephron Physiol* **2006**, *103* (3), p139-48.
103. Heron, M.; van Moorsel, C. H.; Grutters, J. C.; Huizinga, T. W.; van der Helm-van Mil, A. H.; Nagtegaal, M. M.; Ruven, H. J.; van den Bosch, J. M., Genetic variation in GREM1 is a risk factor for fibrosis in pulmonary sarcoidosis. *Tissue Antigens* **2011**, *77* (2), 112-7.
104. McKnight, A. J.; Patterson, C. C.; Pettigrew, K. A.; Savage, D. A.; Kilner, J.; Murphy, M.; Sadlier, D.; Maxwell, A. P.; Warren, U. K. G. o. K. i. D. S. G., A GREM1 gene variant associates with diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* **2010**, *21* (5), 773-81.
105. Mueller, K. A.; Tavlaki, E.; Schneider, M.; Jorbenadze, R.; Geisler, T.; Kandolf, R.; Gawaz, M.; Mueller, II; Zuern, C. S., Gremlin-1 identifies fibrosis and predicts adverse outcome in patients with heart failure undergoing endomyocardial biopsy. *J Card Fail* **2013**, *19* (10), 678-84.

7. Literaturverzeichnis

106. Benazet, J. D.; Bischofberger, M.; Tiecke, E.; Goncalves, A.; Martin, J. F.; Zuniga, A.; Naef, F.; Zeller, R., A self-regulatory system of interlinked signaling feedback loops controls mouse limb patterning. *Science* **2009**, 323 (5917), 1050-3.
107. Kami, D.; Shiojima, I.; Makino, H.; Matsumoto, K.; Takahashi, Y.; Ishii, R.; Naito, A. T.; Toyoda, M.; Saito, H.; Watanabe, M.; Komuro, I.; Umezawa, A., Gremlin enhances the determined path to cardiomyogenesis. *PLoS One* **2008**, 3 (6), e2407.
108. Church, R. H.; Krishnakumar, A.; Urbanek, A.; Geschwindner, S.; Meneely, J.; Bianchi, A.; Basta, B.; Monaghan, S.; Elliot, C.; Stromstedt, M.; Ferguson, N.; Martin, F.; Brazil, D. P., Gremlin1 preferentially binds to bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and BMP-4 over BMP-7. *Biochem J* **2015**, 466 (1), 55-68.
109. Muller, I.; Schonberger, T.; Schneider, M.; Borst, O.; Ziegler, M.; Seizer, P.; Leder, C.; Muller, K.; Lang, M.; Appenzeller, F.; Lunov, O.; Buchele, B.; Fahrleitner, M.; Olbrich, M.; Langer, H.; Geisler, T.; Lang, F.; Chatterjee, M.; de Boer, J. F.; Tietge, U. J.; Bernhagen, J.; Simmet, T.; Gawaz, M., Gremlin-1 is an inhibitor of macrophage migration inhibitory factor and attenuates atherosclerotic plaque growth in ApoE^{-/-} Mice. *J Biol Chem* **2013**, 288 (44), 31635-45.
110. Yao, Y.; Zebboudj, A. F.; Shao, E.; Perez, M.; Bostrom, K., Regulation of bone morphogenetic protein-4 by matrix GLA protein in vascular endothelial cells involves activin-like kinase receptor 1. *J Biol Chem* **2006**, 281 (45), 33921-30.
111. Speer, M. Y.; Yang, H. Y.; Brabb, T.; Leaf, E.; Look, A.; Lin, W. L.; Frutkin, A.; Dichek, D.; Giachelli, C. M., Smooth muscle cells give rise to osteochondrogenic precursors and chondrocytes in calcifying arteries. *Circ Res* **2009**, 104 (6), 733-41.
112. Shu, B.; Zhang, M.; Xie, R.; Wang, M.; Jin, H.; Hou, W.; Tang, D.; Harris, S. E.; Mishina, Y.; O'Keefe, R. J.; Hilton, M. J.; Wang, Y.; Chen, D., BMP2, but not BMP4, is crucial for chondrocyte proliferation and maturation during endochondral bone development. *J Cell Sci* **2011**, 124 (Pt 20), 3428-40.
113. Tsuji, K.; Bandyopadhyay, A.; Harfe, B. D.; Cox, K.; Kakar, S.; Gerstenfeld, L.; Einhorn, T.; Tabin, C. J.; Rosen, V., BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nat Genet* **2006**, 38 (12), 1424-9.
114. Govender, S.; Csimma, C.; Genant, H. K.; Valentin-Opran, A.; Amit, Y.; Arbel, R.; Aro, H.; Atar, D.; Bishay, M.; Borner, M. G.; Chiron, P.; Choong, P.; Cinats, J.; Courtenay, B.; Feibel, R.; Geulette, B.; Gravel, C.; Haas, N.; Raschke, M.; Hammacher, E.; van der Velde, D.; Hardy, P.; Holt, M.; Josten, C.; Ketterl, R. L.; Lindeque, B.; Lob, G.; Mathevon, H.; McCoy, G.; Marsh, D.; Miller, R.; Munting, E.; Oevre, S.; Nordsletten, L.; Patel, A.; Pohl, A.; Rennie, W.; Reynders, P.; Rommens, P. M.; Rondia, J.; Rossouw, W. C.; Daneel, P. J.; Ruff, S.; Ruter, A.; Santavirta, S.; Schildhauer, T. A.; Gekle, C.; Schnettler, R.; Segal, D.; Seiler, H.; Snowdowne, R. B.; Stapert, J.; Taglang, G.; Verdonk, R.; Vogels, L.; Weckbach, A.; Wentzensen, A.; Wisniewski, T.; Group, B. M. P. E. i. S. f. T. T. S., Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am* **2002**, 84-A (12), 2123-34.
115. Swiontkowski, M. F.; Aro, H. T.; Donell, S.; Esterhai, J. L.; Goulet, J.; Jones, A.; Kregor, P. J.; Nordsletten, L.; Paiement, G.; Patel, A., Recombinant human bone morphogenetic protein-2 in open tibial fractures. A subgroup analysis of data combined from two prospective randomized studies. *J Bone Joint Surg Am* **2006**, 88 (6), 1258-65.
116. Bostrom, K.; Watson, K. E.; Horn, S.; Wortham, C.; Herman, I. M.; Demer, L. L., Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* **1993**, 91 (4), 1800-9.

7. Literaturverzeichnis

117. Li, X.; Yang, H. Y.; Giachelli, C. M., BMP-2 promotes phosphate uptake, phenotypic modulation, and calcification of human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* **2008**, *199* (2), 271-7.
118. Zhang, M.; Yang, M.; Liu, L. P.; Lau, W. B.; Gao, H.; Xin, M. K.; Su, L. X.; Wang, J.; Cheng, S. J.; Fan, Q.; Liu, J. H., BMP-2 overexpression augments vascular smooth muscle cell motility by upregulating myosin Va via Erk signaling. *Oxid Med Cell Longev* **2014**, *2014*, 294150.
119. Simoes Sato, A. Y.; Bub, G. L.; Campos, A. H., BMP-2 and -4 produced by vascular smooth muscle cells from atherosclerotic lesions induce monocyte chemotaxis through direct BMPRII activation. *Atherosclerosis* **2014**, *235* (1), 45-55.
120. Winnier, G.; Blessing, M.; Labosky, P. A.; Hogan, B. L., Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev* **1995**, *9* (17), 2105-16.
121. Furuta, Y.; Hogan, B. L., BMP4 is essential for lens induction in the mouse embryo. *Genes Dev* **1998**, *12* (23), 3764-75.
122. Milano, F.; van Baal, J. W.; Buttar, N. S.; Rygiel, A. M.; de Kort, F.; DeMars, C. J.; Rosmolen, W. D.; Bergman, J. J.; J, V. A. M.; Wang, K. K.; Peppelenbosch, M. P.; Krishnadath, K. K., Bone morphogenetic protein 4 expressed in esophagitis induces a columnar phenotype in esophageal squamous cells. *Gastroenterology* **2007**, *132* (7), 2412-21.
123. Deng, H.; Makizumi, R.; Ravikumar, T. S.; Dong, H.; Yang, W.; Yang, W. L., Bone morphogenetic protein-4 is overexpressed in colonic adenocarcinomas and promotes migration and invasion of HCT116 cells. *Exp Cell Res* **2007**, *313* (5), 1033-44.
124. Buckley, S.; Shi, W.; Driscoll, B.; Ferrario, A.; Anderson, K.; Warburton, D., BMP4 signaling induces senescence and modulates the oncogenic phenotype of A549 lung adenocarcinoma cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2004**, *286* (1), L81-6.
125. Sorescu, G. P.; Sykes, M.; Weiss, D.; Platt, M. O.; Saha, A.; Hwang, J.; Boyd, N.; Boo, Y. C.; Vega, J. D.; Taylor, W. R.; Jo, H., Bone morphogenetic protein 4 produced in endothelial cells by oscillatory shear stress stimulates an inflammatory response. *J Biol Chem* **2003**, *278* (33), 31128-35.
126. Jo, H.; Song, H.; Mowbray, A., Role of NADPH oxidases in disturbed flow- and BMP4- induced inflammation and atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal* **2006**, *8* (9-10), 1609-19.
127. Wong, W. T.; Tian, X. Y.; Chen, Y.; Leung, F. P.; Liu, L.; Lee, H. K.; Ng, C. F.; Xu, A.; Yao, X.; Vanhoutte, P. M.; Tipoe, G. L.; Huang, Y., Bone morphogenic protein-4 impairs endothelial function through oxidative stress-dependent cyclooxygenase-2 upregulation: implications on hypertension. *Circ Res* **2010**, *107* (8), 984-91.
128. Sorescu, G. P.; Song, H.; Tressel, S. L.; Hwang, J.; Dikalov, S.; Smith, D. A.; Boyd, N. L.; Platt, M. O.; Lassegue, B.; Griending, K. K.; Jo, H., Bone morphogenic protein 4 produced in endothelial cells by oscillatory shear stress induces monocyte adhesion by stimulating reactive oxygen species production from a nox1-based NADPH oxidase. *Circ Res* **2004**, *95* (8), 773-9.
129. Patel, S. R.; Dressler, G. R., BMP7 signaling in renal development and disease. *Trends Mol Med* **2005**, *11* (11), 512-8.
130. Tomita, M.; Asada, M.; Asada, N.; Nakamura, J.; Oguchi, A.; Higashi, A. Y.; Endo, S.; Robertson, E.; Kimura, T.; Kita, T.; Economides, A. N.; Kreidberg, J.; Yanagita, M., Bmp7 maintains undifferentiated kidney progenitor population and determines nephron numbers at birth. *PLoS One* **2013**, *8* (8), e73554.

7. Literaturverzeichnis

131. Luo, G.; Hofmann, C.; Bronckers, A. L.; Sohocki, M.; Bradley, A.; Karsenty, G., BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes Dev* **1995**, *9* (22), 2808-20.
132. Zeisberg, M.; Hanai, J.; Sugimoto, H.; Mammoto, T.; Charytan, D.; Strutz, F.; Kalluri, R., BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med* **2003**, *9* (7), 964-8.
133. Rocher, C.; Singla, R.; Singal, P. K.; Parthasarathy, S.; Singla, D. K., Bone morphogenetic protein 7 polarizes THP-1 cells into M2 macrophages. *Can J Physiol Pharmacol* **2012**, *90* (7), 947-51.
134. Lee, M. J.; Yang, C. W.; Jin, D. C.; Chang, Y. S.; Bang, B. K.; Kim, Y. S., Bone morphogenetic protein-7 inhibits constitutive and interleukin-1 beta-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in human mesangial cells: role for JNK/AP-1 pathway. *J Immunol* **2003**, *170* (5), 2557-63.
135. Davies, M. R.; Lund, R. J.; Hruska, K. A., BMP-7 is an efficacious treatment of vascular calcification in a murine model of atherosclerosis and chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* **2003**, *14* (6), 1559-67.
136. Sovershaev, M. A.; Egorina, E. M.; Bogdanov, V. Y.; Seredkina, N.; Fallon, J. T.; Valkov, A. Y.; Osterud, B.; Hansen, J. B., Bone morphogenetic protein -7 increases thrombogenicity of lipid-rich atherosclerotic plaques via activation of tissue factor. *Thromb Res* **2010**, *126* (4), 306-10.
137. Kobayashi, A.; Okuda, H.; Xing, F.; Pandey, P. R.; Watabe, M.; Hirota, S.; Pai, S. K.; Liu, W.; Fukuda, K.; Chambers, C.; Wilber, A.; Watabe, K., Bone morphogenetic protein 7 in dormancy and metastasis of prostate cancer stem-like cells in bone. *J Exp Med* **2011**, *208* (13), 2641-55.
138. RayBio® C-Series Human Cytokine Antibody Array C6, Manual, 2016, RayBiotech, 3607 Parkway Lane, Suite 100 Norcross, GA 30092.
139. Chatterjee, M.; von Ungern-Sternberg, S. N.; Seizer, P.; Schlegel, F.; Buttcher, M.; Sindhu, N. A.; Muller, S.; Mack, A.; Gawaz, M., Platelet-derived CXCL12 regulates monocyte function, survival, differentiation into macrophages and foam cells through differential involvement of CXCR4-CXCR7. *Cell Death Dis* **2015**, *6*, e1989.
140. Savikko, J.; Rintala, J. M.; Rintala, S.; Koskinen, P., Epidermal growth factor receptor inhibition by erlotinib prevents vascular smooth muscle cell and monocyte-macrophage function in vitro. *Transpl Immunol* **2015**, *32* (3), 175-8.
141. Deshmane, S. L.; Kremlev, S.; Amini, S.; Sawaya, B. E., Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *Journal of Interferon & Cytokine Research* **2009**, *29* (6), 313-326.
142. Palframan, R. T.; Jung, S.; Cheng, G.; Weninger, W.; Luo, Y.; Dorf, M.; Littman, D. R.; Rollins, B. J.; Zweerink, H.; Rot, A.; von Andrian, U. H., Inflammatory Chemokine Transport and Presentation in HEV: A Remote Control Mechanism for Monocyte Recruitment to Lymph Nodes in Inflamed Tissues. *The Journal of Experimental Medicine* **2001**, *194* (9), 1361-1374.
143. Pitsilos, S.; Hunt, J.; Mohler, E. R.; Prabhakar, A. M.; Poncz, M.; Dawicki, J.; Khalapyan, T. Z.; Wolfe, M. L.; Fairman, R.; Mitchell, M.; Carpenter, J.; Golden, M. A.; Cines, D. B.; Sachais, B. S., Platelet factor 4 localization in carotid atherosclerotic plaques: correlation with clinical parameters. *Thromb Haemost* **2003**, *90* (6), 1112-20.
144. Smith, C.; Damas, J. K.; Otterdal, K.; Oie, E.; Sandberg, W. J.; Yndestad, A.; Waehre, T.; Scholz, H.; Endresen, K.; Olofsson, P. S.; Halvorsen, B.; Gullestad, L.; Froland, S. S.; Hansson, G. K.; Aukrust, P., Increased levels of neutrophil-activating

7. Literaturverzeichnis

- peptide-2 in acute coronary syndromes: possible role of platelet-mediated vascular inflammation. *J Am Coll Cardiol* **2006**, 48 (8), 1591-9.
145. Maurer, M.; von Stebut, E., Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biol* **2004**, 36 (10), 1882-6.
146. Hwang, J.; Kim, C. W.; Son, K. N.; Han, K. Y.; Lee, K. H.; Kleinman, H. K.; Ko, J.; Na, D. S.; Kwon, B. S.; Gho, Y. S.; Kim, J., Angiogenic activity of human CC chemokine CCL15 in vitro and in vivo. *FEBS Lett* **2004**, 570 (1-3), 47-51.
147. Song, R.; Liu, S.; Leong, K. W., Effects of MIP-1 alpha, MIP-3 alpha, and MIP-3 beta on the induction of HIV Gag-specific immune response with DNA vaccines. *Mol Ther* **2007**, 15 (5), 1007-15.
148. Rubie, C.; Frick, V. O.; Wagner, M.; Rau, B.; Weber, C.; Kruse, B.; Kempf, K.; Tilton, B.; Konig, J.; Schilling, M., Enhanced expression and clinical significance of CC-chemokine MIP-3 alpha in hepatocellular carcinoma. *Scand J Immunol* **2006**, 63 (6), 468-77.
149. Hiwatashi, K.; Tamiya, T.; Hasegawa, E.; Fukaya, T.; Hashimoto, M.; Kakoi, K.; Kashiwagi, I.; Kimura, A.; Inoue, N.; Morita, R.; Yasukawa, H.; Yoshimura, A., Suppression of SOCS3 in macrophages prevents cancer metastasis by modifying macrophage phase and MCP2/CCL8 induction. *Cancer Lett* **2011**, 308 (2), 172-80.
150. Eriksson, E. E., Mechanisms of leukocyte recruitment to atherosclerotic lesions: future prospects. *Curr Opin Lipidol* **2004**, 15 (5), 553-8.
151. Devergne, O.; Marfaing-Koka, A.; Schall, T. J.; Leger-Ravet, M. B.; Sadick, M.; Peuchmaur, M.; Crevon, M. C.; Kim, K. J.; Schall, T. T.; Kim, T.; et al., Production of the RANTES chemokine in delayed-type hypersensitivity reactions: involvement of macrophages and endothelial cells. *J Exp Med* **1994**, 179 (5), 1689-94.
152. Huo, Y.; Schober, A.; Forlow, S. B.; Smith, D. F.; Hyman, M. C.; Jung, S.; Littman, D. R.; Weber, C.; Ley, K., Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat Med* **2003**, 9 (1), 61-7.
153. Nishimoto, N.; Kishimoto, T., Interleukin 6: from bench to bedside. *Nat Clin Pract Rheumatol* **2006**, 2 (11), 619-26.
154. Jones, S. A., Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol* **2005**, 175 (6), 3463-8.
155. Hartman, J.; Frishman, W. H., Inflammation and atherosclerosis: a review of the role of interleukin-6 in the development of atherosclerosis and the potential for targeted drug therapy. *Cardiol Rev* **2014**, 22 (3), 147-51.
156. Mosser, D. M.; Zhang, X., Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev* **2008**, 226, 205-18.
157. Gazzinelli, R. T.; Wysocka, M.; Hieny, S.; Scharon-Kersten, T.; Cheever, A.; Kuhn, R.; Muller, W.; Trinchieri, G.; Sher, A., In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol* **1996**, 157 (2), 798-805.
158. Hunter, C. A.; Ellis-Neyes, L. A.; Slifer, T.; Kanaly, S.; Grunig, G.; Fort, M.; Rennick, D.; Araujo, F. G., IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* **1997**, 158 (7), 3311-6.
159. Xinbing, H.; Boisvert, W. A. The Role of IL-10 in Atherosclerosis, Atherogenesis, Prof. Sampath Parthasarathy (Ed.), ISBN: 978-953-307-992-9, InTech.
160. Tedgui, A.; Mallat, Z., Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* **2006**, 86 (2), 515-81.

7. Literaturverzeichnis

161. Han, X.; Kitamoto, S.; Wang, H.; Boisvert, W. A., Interleukin-10 overexpression in macrophages suppresses atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *FASEB J* **2010**, *24* (8), 2869-80.
162. Yu, X. H.; Fu, Y. C.; Zhang, D. W.; Yin, K.; Tang, C. K., Foam cells in atherosclerosis. *Clin Chim Acta* **2013**, *424*, 245-52.
163. Badimon, L.; Vilahur, G., Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J Intern Med* **2014**, *276* (6), 618-32.
164. Zernecke, A.; Shagdarsuren, E.; Weber, C., Chemokines in atherosclerosis: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2008**, *28* (11), 1897-908.
165. Muller, II; Chatterjee, M.; Schneider, M.; Borst, O.; Seizer, P.; Schonberger, T.; Vogel, S.; Muller, K. A.; Geisler, T.; Lang, F.; Langer, H.; Gawaz, M., Gremlin-1 inhibits macrophage migration inhibitory factor-dependent monocyte function and survival. *Int J Cardiol* **2014**, *176* (3), 923-9.
166. Chatterjee, M.; Behrendt, A.; Schmid, M.; Beck, S.; Schneider, M.; Mack, A.; Muller, I.; Geisler, T.; Gawaz, M., Platelets as a novel source of Gremlin-1: Implications for thromboinflammation. *Thromb Haemost* **2016**.
167. Chen, B.; Blair, D. G.; Plisov, S.; Vasiliev, G.; Perantoni, A. O.; Chen, Q.; Athanasiou, M.; Wu, J. Y.; Oppenheim, J. J.; Yang, D., Cutting edge: bone morphogenetic protein antagonists Drm/Gremlin and Dan interact with Slits and act as negative regulators of monocyte chemotaxis. *J Immunol* **2004**, *173* (10), 5914-7.
168. Nakagawa, Y.; Ikeda, K.; Akakabe, Y.; Koide, M.; Uraoka, M.; Yutaka, K. T.; Kurimoto-Nakano, R.; Takahashi, T.; Matoba, S.; Yamada, H.; Okigaki, M.; Matsubara, H., Paracrine osteogenic signals via bone morphogenetic protein-2 accelerate the atherosclerotic intimal calcification in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2010**, *30* (10), 1908-15.
169. Singla, D. K.; Singla, R.; Wang, J., BMP-7 Treatment Increases M2 Macrophage Differentiation and Reduces Inflammation and Plaque Formation in Apo E-/- Mice. *PLoS One* **2016**, *11* (1), e0147897.
170. Worthley, D. L.; Churchill, M.; Compton, J. T.; Tailor, Y.; Rao, M.; Si, Y.; Levin, D.; Schwartz, M. G.; Uygur, A.; Hayakawa, Y.; Gross, S.; Renz, B. W.; Setlik, W.; Martinez, A. N.; Chen, X.; Nizami, S.; Lee, H. G.; Kang, H. P.; Caldwell, J. M.; Asfaha, S.; Westphalen, C. B.; Graham, T.; Jin, G.; Nagar, K.; Wang, H.; Kheirbek, M. A.; Kolhe, A.; Carpenter, J.; Glaire, M.; Nair, A.; Renders, S.; Manieri, N.; Muthupalani, S.; Fox, J. G.; Reichert, M.; Giraud, A. S.; Schwabe, R. F.; Pradere, J. P.; Walton, K.; Prakash, A.; Gumucio, D.; Rustgi, A. K.; Stappenbeck, T. S.; Friedman, R. A.; Gershon, M. D.; Sims, P.; Grikscheit, T.; Lee, F. Y.; Karsenty, G.; Mukherjee, S.; Wang, T. C., Gremlin 1 identifies a skeletal stem cell with bone, cartilage, and reticular stromal potential. *Cell* **2015**, *160* (1-2), 269-84.
171. Wirtz, T. H.; Tillmann, S.; Strussmann, T.; Kraemer, S.; Heemskerk, J. W.; Grottko, O.; Gawaz, M.; von Hundelshausen, P.; Bernhagen, J., Platelet-derived MIF: a novel platelet chemokine with distinct recruitment properties. *Atherosclerosis* **2015**, *239* (1), 1-10.
172. Gregory, J. L.; Morand, E. F.; McKeown, S. J.; Ralph, J. A.; Hall, P.; Yang, Y. H.; McColl, S. R.; Hickey, M. J., Macrophage migration inhibitory factor induces macrophage recruitment via CC chemokine ligand 2. *J Immunol* **2006**, *177* (11), 8072-9.
173. Han, E. J.; Yoo, S. A.; Kim, G. M.; Hwang, D.; Cho, C. S.; You, S.; Kim, W. U., GREM1 Is a Key Regulator of Synoviocyte Hyperplasia and Invasiveness. *J Rheumatol* **2016**, *43* (3), 474-85.
174. O'Reilly, S.; Ciechomska, M.; Cant, R.; van Laar, J. M., Interleukin-6 (IL-6) trans signaling drives a STAT3-dependent pathway that leads to hyperactive

7. Literaturverzeichnis

transforming growth factor-beta (TGF-beta) signaling promoting SMAD3 activation and fibrosis via Gremlin protein. *J Biol Chem* **2014**, 289 (14), 9952-60.

175. Persson, J.; Nilsson, J.; Lindholm, M. W., Cytokine response to lipoprotein lipid loading in human monocyte-derived macrophages. *Lipids Health Dis* **2006**, 5, 17.

176. Berres, M. L.; Koenen, R. R.; Rueland, A.; Zaldivar, M. M.; Heinrichs, D.; Sahin, H.; Schmitz, P.; Streetz, K. L.; Berg, T.; Gassler, N.; Weiskirchen, R.; Proudfoot, A.; Weber, C.; Trautwein, C.; Wasmuth, H. E., Antagonism of the chemokine Ccl5 ameliorates experimental liver fibrosis in mice. *J Clin Invest* **2010**, 120 (11), 4129-40.

177. Zhang, M.; Sara, J. D.; Wang, F. L.; Liu, L. P.; Su, L. X.; Zhe, J.; Wu, X.; Liu, J. H., Increased plasma BMP-2 levels are associated with atherosclerosis burden and coronary calcification in type 2 diabetic patients. *Cardiovasc Diabetol* **2015**, 14, 64.

178. Cai, J.; Pardali, E.; Sanchez-Duffhues, G.; ten Dijke, P., BMP signaling in vascular diseases. *FEBS Lett* **2012**, 586 (14), 1993-2002.

8. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der medizinischen Klinik III des Universitätsklinikum Tübingen unter Betreuung von Frau PD Dr. I. Müller durchgeführt.

Die Konzeption der Arbeit erfolgte durch Frau PD Dr. I. Müller.

Sämtliche Versuche wurden (nach Einarbeitung durch eine Labormitarbeiterin [Klaudia Posavec]) von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Frau Dr. K. Müller durch mich.

Ich versichere, dass Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, 26.09.2017

9. Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Frau PD Dr. Iris Müller bedanken, die durch die Bereitstellung des Themas und die hervorragende und stets hilfsbereite Betreuung während des gesamten Entstehungsprozesses dieser Arbeit maßgeblich zu ihrem Gelingen beigetragen hat.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. Karin Müller bedanken, die sich viel Zeit genommen hat, um gemeinsam mit mir die statistische Auswertung dieser Arbeit vorzunehmen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Klaudia Posavec, die mir im Labor bei jeder offenen Frage und jedem Problem kompetent und freundlich weitergeholfen hat.

Meiner Familie und Eva möchte ich für die uneingeschränkte Unterstützung und die Ermutigung, auch bei Rückschlägen weiterzuarbeiten, danken, ohne die diese Arbeit niemals möglich gewesen wäre.

10. Lebenslauf

Name: Buchal
Vorname: Thomas Robert
Geburtstag: 23.05.1991
Geburtsort: Konstanz
Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung

1997-2001 Grundschule Litzelstetten
2001-2010 Heinrich-Suso-Gymnasium Konstanz
2010 Abitur

Studium

2011-2017 Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen
13.10.2016 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung in Eningen
07.12.2017 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung in Tübingen