

Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**Die IL-6-Produktion in Kokulturen muriner
kardiovaskulärer Zellen mit murinen mononukleären
Zellen ist synergistisch erhöht**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Anne Marie Larisch

geboren am 23. Dezember 1986 in Dresden

Betreuer: Prof. Dr. Harald Loppnow

Gutachter: Prof. Dr. Harald Loppnow

Prof. Dr. Andreas Simm

Prof. Dr. Attila Tárnok (Leipzig)

03. September 2019

21. April 2020

Referat und bibliografische Angaben

Zielsetzung

Forschungen der letzten Jahre konnten die zentrale Bedeutung entzündlicher Prozesse für den Verlauf und die Prognose atherosklerotischer Erkrankungen hervorheben. Interleukin-6 (IL-6) ist dabei am komplexen inflammatorischen Zusammenspiel beteiligt. In Kokulturen humaner Gefäßmuskelzellen und Monozyten war eine überadditive (synergistische) IL-6-Sekretion nachgewiesen worden, welche unter anderem über Interleukin-1 (IL-1) vermittelt wurde. Auch kardiale Zellen scheinen inflammatorisch aktiv zu sein. Daher soll in der vorliegenden Arbeit anhand der Sekretion von IL-6 untersucht werden, ob auch Kardiomyozyten und kardiale Fibroblasten in Kokulturen mit mononukleären Zellen synergistisch IL-6 produzieren.

Methoden

Es wurden Kardiomyozyten, Fibroblasten, Gefäßmuskelzellen bzw. mononukleäre Zellen neonataler Wistarratten und humane Gefäßmuskelzellen bzw. mononukleäre Zellen in Kokulturen untersucht. Die IL-6-Konzentration in den Kokulturen wurde mithilfe des 7TD1-Bioassays bestimmt.

Ergebnisse

In Kokulturen muriner Gefäßmuskelzellen, Fibroblasten oder Kardiomyozyten mit humanen bzw. murinen mononukleären Zellen zeigte sich unter Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) eine synergistische IL-6-Sekretion. Unter Anwesenheit eines IL-1-Rezeptorantagonisten war der Synergismus in allen untersuchten Kokulturen deutlich reduziert. Es ist daher anzunehmen, dass IL-1 entscheidend an der zellulären Interaktion beteiligt ist. Neben dem exogenen Stimulus LPS wurden auch endogene Stimuli getestet. Hierbei zeigte sich unter Stimulation der Kokultur mit 25-Hydroxycholesterol, IL-1 α oder Tumornekrosefaktor- α ebenfalls eine gesteigerte IL-6-Sekretion. Weiterhin war insbesondere unter 25-Hydroxycholesterol-Stimulierung eine deutliche Zunahme des Synergismus der IL-6-Sekretion in Kokultur zu verzeichnen.

Diskussion

Die vorliegenden Daten zeigen anhand der IL-6-Sekretion die inflammatorische Potenz kardiovaskulärer Zellen auf, welche durch Interaktion mit mononukleären Zellen synergistisch verstärkt wird. Dies kann für die Pathogenese verschiedener kardialer Erkrankungen relevant sein. Zudem verdeutlichen die Ergebnisse, dass murine Modelle zukünftig eine geeignete Grundlage weitergehender Untersuchungen darstellen können.

Larisch, Anne Marie: Die IL-6-Produktion in Kokulturen muriner kardiovaskulärer Zellen mit murinen mononukleären Zellen ist synergistisch erhöht
Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 71 Seiten, 2019

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	IV
1	Einleitung	1
1.1	Inflammatorische Prozesse sind ein entscheidender Pathomechanismus der Atherosklerose	1
1.2	Inflammatorische Prozesse bestimmen auch den Verlauf kardialer Erkrankungen	3
1.3	Interleukin-6 (IL-6) ist ein wichtiger Mediator bei der Vermittlung inflammatorischer Prozesse in der Atherogenese	5
1.4	Kokulturmodelle zeigen zelluläre inflammatorische Interaktionen zwischen Gefäßmuskelzellen und mononukleären Zellen auf	7
1.5	Kulturversuche zeigen die inflammatorische Aktivität von Kardiomyozyten	8
2	Zielstellung	10
3	Material und Methoden	11
3.1	Zellkulturmaterialien und Medien	11
3.2	Zellen	12
3.2.1	Isolierung und Kultivierung humaner Gefäßmuskelzellen	13
3.2.2	Isolierung und Kultivierung muriner Gefäßmuskelzellen	13
3.2.3	Isolierung und Kultivierung neonataler Rattenkardiomyozyten und kardialer Fibroblasten	13
3.2.4	Isolierung humaner mononukleärer Zellen aus <i>Buffy Coat</i>	14
3.2.5	Isolierung muriner mononukleärer Zellen aus Rattenblut	15
3.3	Durchführung der Kokulturversuche	15
3.4	Nachweismethoden von Interleukin-6 in den Zellkultur-Überständen	17
3.4.1	Messung der IL-6-Aktivität mittels 7TD1-Bioassay	17
3.4.2	Messung der IL-6-Konzentration mittels ELISA	18
3.5	Statistische Auswertung	19
4	Ergebnisse	20
4.1	ELISA und 7TD1-Test liefern als Messmethode zur IL-6-Bestimmung vergleichbare Ergebnisse	20
4.2	In Kokulturen humaner Gefäßmuskelzellen und mononukleärer Zellen ist eine synergistische IL-6-Sekretion nachweisbar	21
4.3	Analyse der IL-6-Produktion muriner kardiovaskulärer Zellen in Kokulturen mit humanen mononukleären Zellen	23

4.3.1	In Kokulturen von Gefäßmuskelzellen der Maus und humanen mononukleären Zellen ist eine synergistische IL-6-Sekretion nachweisbar	24
4.3.2	In Kokulturen von Gefäßmuskelzellen der Ratte und humanen mononukleären Zellen ist eine synergistische IL-6-Sekretion nachweisbar	25
4.3.3	In Kokulturen von Kardiomyozyten der Ratte und humanen mononukleären Zellen ist eine synergistische IL-6-Sekretion nachweisbar	26
4.3.4	In Kokulturen von kardialen Fibroblasten der Ratte und humanen mononukleären Zellen ist eine synergistische IL-6-Sekretion nachweisbar	28
4.4	Analyse der IL-6-Produktion muriner kardiovaskulärer Zellen in Kokulturen mit murinen mononukleären Zellen	30
4.4.1	In Kokulturen von Gefäßmuskelzellen und mononukleären Zellen der Ratte ist eine synergistische IL-6-Sekretion nachweisbar	30
4.4.2	In Kokulturen von Kardiomyozyten und mononukleären Zellen der Ratte ist eine synergistische IL-6-Sekretion nachweisbar	32
4.4.3	In Kokulturen von kardialen Fibroblasten und mononukleären Zellen der Ratte ist eine synergistische IL-6-Sekretion nachweisbar	35
4.5	Einfluss von IL-1 auf die Interaktion im Kokulturmodell	36
4.5.1	Der IL-1-Rezeptorantagonist vermindert die IL-6-Sekretion in der Kokultur von Gefäßmuskelzellen der Ratte mit humanen mononukleären Zellen	36
4.5.2	Der IL-1-Rezeptorantagonist vermindert die IL-6-Sekretion in der Kokultur von Kardiomyozyten der Ratte und humanen mononukleären Zellen	37
4.5.3	Der IL-1-Rezeptorantagonist vermindert die IL-6-Sekretion in der Kokultur von kardialen Fibroblasten der Ratte und humanen mononukleären Zellen	38
4.5.4	Der IL-1-Rezeptorantagonist vermindert die IL-6-Sekretion in der Kokultur von Gefäßmuskelzellen und mononukleären Zellen der Ratte	39
4.5.5	Der IL-1-Rezeptorantagonist vermindert die IL-6-Sekretion in der Kokultur von Kardiomyozyten und mononukleären Zellen der Ratte	40
5	Diskussion	42
5.1	Neben Gefäßmuskelzellen zeigen auch Kardiomyozyten und kardiale Fibroblasten in Kokulturen mit mononukleären Zellen eine synergistische IL 6-Sekretion	42

5.2	LPS, Chol, IL-1 α und TNF stimulieren in Kokulturen von Kardiomyozyten und mononukleären Zellen eine synergistische IL-6-Sekretion	44
5.3	IL-1 ist entscheidend an der Vermittlung der synergistischen IL 6 Sekretion in allen getesteten Kokulturmodellen beteiligt	47
5.4	Limitationen	48
5.5	Ausblick	49
6	Zusammenfassung	50
7	Literaturverzeichnis	53
8	Thesen	61
A	Anlagen	
A.1	Lebenslauf	
A.2	Selbstständigkeitserklärung	
A.3	Erklärung über frühere Promotionsversuche	
A.4	Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis

7TD1-Zellen	Interleukin-6-abhängige murine B-Zelllinie
BSA	Bovines Serumalbumin
Chol	25-Hydroxycholesterol
CMRL	<i>Connaught Medical Research Laboratories</i>
CRP	C-reaktives Protein
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
ED ₅₀	Mittlere effektive Dosis
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
Fib	Fibroblasten
FKS	Fetales Kälberserum
GMZ	Gefäßmuskelzellen
gp130	Glykoprotein 130
IL-1	Interleukin-1
IL-1-RA	Interleukin-1-Rezeptorantagonist
IL-6	Interleukin-6
IL-6R	Interleukin-6-Rezeptor
LPS	Lipopolysaccharid, Endotoxin
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
M-CSF	Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
MMP-1	Matrix-Metalloproteinase-1
MNZ	Mononukleäre Zellen
nRKM	Neonatale Rattenkardiomyozyten
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
sIL-6R	Löslicher Interleukin-6-Rezeptor
THP-1	Humane monozytenartige Zelllinie
TNF	Tumornekrosefaktor- α
U937	Humane monozytenartige Zelllinie
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

1 Einleitung

Weltweit stellen kardiovaskuläre Erkrankungen laut der Weltgesundheitsorganisation WHO bereits seit Jahren die häufigste Todesursache dar und voraussichtlich werden sie auch in den kommenden Jahren diesen Platz einnehmen **[Murray und Lopez, 1997]**. Dabei gehen in der westlichen Gesellschaft schätzungsweise 50 % der Todesfälle auf kardiovaskuläre Ereignisse wie Schlaganfall, Herzinsuffizienz, Herzinfarkt oder Stenoserezidive zurück. Atherosklerose ist hierbei die häufigste zugrunde liegende Erkrankung und ihrerseits wiederum ein multifaktorielles Geschehen **[Ross, 1993]**. Seit langem bekannte Risikofaktoren für die atherosklerotische Genese sind Hypercholesterinämie und Hypertonus. Weiterhin sind auch männliches Geschlecht, fortschreitendes Alter, Zigarettenkonsum, Übergewicht, eine fettreiche Ernährung und eine inaktive Lebensweise mit dem vermehrten Auftreten von atherosklerotischen Plaques assoziiert. Im Rahmen der Atheroskleroseentwicklung kommt es zur Einlagerung modifizierten Cholesterols in die Gefäßwand, wodurch das die Gefäße auskleidende Endothel zunehmend dysfunktional wird. Die im Verlauf fortschreitend eingeschränkte sekretorische Kapazität des Endothels, welches in intaktem Zustand unter anderem über Hemmung von Thrombozytenaggregation und Monozytenadhäsion sowie durch Unterdrückung von Koagulation und Gefäßmuskelzellwachstum vasoprotektiv wirkt, begünstigt dabei zusätzlich ein Wachstum atherosklerotischer Plaques. Auch die lokal vermittelte Vasodilatation kann mit fortschreitender Endotheldysfunktion weniger effektiv zum Offenhalten der atherosklerotisch verengten Gefäße genutzt werden **[Vogel, 1997]**. Jüngere Untersuchungen heben neben der zentralen Rolle von Endothelzellen zunehmend auch den Einfluss von Gefäßmuskelzellen und ortsständigen Leukozyten auf die Atheroskleroseentwicklung hervor. So sind diese entscheidend in inflammatorische Prozesse an der Gefäßzellwand involviert, die über die letzten Jahre in den Fokus der Atheroskleroseforschung gerückt sind **[Ross, 1999; Libby, 2002; Hansson und Libby, 2006]**.

1.1 Inflammatorische Prozesse sind ein entscheidender Pathomechanismus der Atherosklerose

Auch wenn sich Bluthochdruck, Hypercholesterinämie, Zigarettenkonsum, Diabetes mellitus, Übergewicht sowie körperliche Inaktivität in den vergangenen Jahren klar als begünstigende Faktoren kardiovaskulärer Ereignisse bestätigt haben, sind bei ungefähr der Hälfte der betroffenen Personen keine dieser Risikofaktoren bekannt **[Braunwald, 1997]**. Bei der Suche nach weiteren geeigneten Risikomarkern sind Forscher auf den Einfluss von Entzündungsprozessen auf die Atheroskleroseentwicklung aufmerksam geworden. So konnte in epidemiologischen und klinischen Studien ein starker und kohärenter Zusammenhang zwischen erhöhten Entzündungsmarkern und zukünftigen

kardiovaskulären Ereignissen gezeigt werden [Willerson und Ridker, 2004].

Entzündliche Prozesse scheinen hierbei für alle Schritte der atherosklerotischen Genese von zentraler Bedeutung zu sein [Packard und Libby, 2008]. Die frühe Phase der Atherosklerose ist gekennzeichnet durch eine Aktivierung des Gefäßendothels. Aus dieser resultiert eine vermehrte Durchlässigkeit der Gefäßwand für Plasmaproteine [Zhang et al., 1993] sowie die vermehrte Einwanderung von Leukozyten in die innerste Schicht der Gefäßwand (Intima). In Folge kommt es so zur Ausbildung erster sichtbarer aber noch asymptomatischer Veränderungen der Gefäßwand, den sogenannten „*fatty streaks*“, Intimaregionen, in die vermehrt Leukozyten eingelagert sind [Stary et al., 1994; Napoli et al., 1997]. Entsprechend der „*response-to-injury*“-Theorie ist davon auszugehen, dass die zugrunde liegende Endothelzell-Aktivierung hierbei durch einen oder mehrere einer Reihe möglicher Wege vermittelt wird [Ross, 1999]. Neben oxidierten oder anderweitig modifizierten LDL-Lipoproteinen, freien Radikalen (beispielsweise als Folge von Zigarettenkonsum), erhöhten Plasma-Homozysteinkonzentrationen und einer verstärkten intravaskulären Schubspannung bei Bluthochdruck gehören auch bakterielle Antigene sowie endogene inflammatorische Signale wie Zytokine und Chemokine zu den möglichen Initiatoren. So stellen chronische Infektionen beispielsweise der Atem- oder Harnwege selbst für Individuen, die sonst frei von konventionellen Risikofaktoren sind, ein erhöhtes Atheroskleroserisiko dar [Kiechl et al., 2001]. Auch ließ sich in einer prospektiven Studie anhand des Plasmaspiegels von Endotoxin, einem Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien, für Probanden ein erhöhtes Risiko zur Atheroskleroseentwicklung vorhersagen [Wiedermann, 1999].

Die atherosklerotische Pathogenese wird in ihrem weiteren Verlauf maßgeblich von den in die Intima eingewanderten Leukozyten beeinflusst. Adhäsive Moleküle, welche von aktivierten Endothelzellen exprimiert werden und die Anlagerung und Einwanderung von Leukozyten unterstützen, sind beispielsweise *vascular cell adhesion molecule-1* [Cybulsky et al., 2001] und *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) [Aiello et al., 1999]. Einmal in die Intima eingewanderte Monozyten wandeln sich dort in Makrophagen um, welche an ihrer Oberfläche Scavenger-Rezeptoren zur Aufnahme modifizierter Lipoproteine exprimieren. Dies erfolgt unter Einfluss des Makrophagen-Koloniestimulierenden Faktors (M-CSF) und bedingt die Differenzierung von Monozyten zu Schaumzell-Makrophagen. Weiterhin steigert M-CSF Proliferation und Überleben von Makrophagen in der Gefäßwand [Qiao et al., 1997]. So reichern sich mehr und mehr lipidgefüllte Schaumzell-Makrophagen, die unter den eingewanderten Leukozyten den Hauptanteil darstellen, in der Kernregion der atherosklerotischen Läsion an und befeuern gleichsam durch Sekretion zahlreicher Wachstumsfaktoren und Zytokine, wie beispielsweise Tumornekrosefaktor- α (TNF) und Interleukin-1 β (IL-1 β), die inflammatorische Antwort [Packard und Libby, 2008]. Auch die innerhalb der Läsion

aktivierten T-Lymphozyten tragen durch Ausschüttung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren zum Entzündungsgeschehen bei. Das resultierende inflammatorische Milieu bewirkt unter anderem eine verstärkte Proliferation von Gefäßmuskelzellen in der muskulären Gefäßschicht (Media) sowie die Migration einzelner Gefäßmuskelzellen in den Bereich der Intimaläsion **[Ross und Glomset, 1973; Jonasson et al., 1986]**. In einem komplexen Wechselspiel der beteiligten Schaumzell-Makrophagen, T-Lymphozyten und Gefäßmuskelzellen kommt es zu einem Umbau der Läsion hin zu einem komplizierten Atherom mit fibröser Kappe. Aufgrund der Überproduktion fibrösen Gewebes setzt eine Verdickung der Gefäßwand ein. Weiterhin tragen alle erwähnten Zelltypen durch Sekretion inflammatorischer Zytokine wie IL-1 oder TNF zur fortwährenden Expression von Adhäsionsmolekülen und so zur Anlagerung und Einwanderung weiterer Leukozyten in das Gefäßendothel bei **[Ridker et al., 1998]**.

In der Kernregion des Atheroms gehen, vermittelt durch dieses entzündliche Milieu, vermehrt Schaumzell-Makrophagen zugrunde und entleeren ihren lipidhaltigen Inhalt. Der zunehmend nekrotische Kern wird durch die fibröse Kappe des Atheroms vom Gefäßinneren abgeschirmt **[Kaperonis et al., 2006]**. Werden allerdings die Kollagenfasern dieser schützenden Fibrinkappe durch proteolytische Enzyme, wie beispielsweise den von Gefäßmuskelzellen nach Stimulation durch aktivierte T-Lymphozyten sezernierten Matrix-Metalloproteinasen, kritisch ausgedünnt, kann es zur spontanen Ruptur des Atheroms und so zur intravasalen Gerinnung mit fatalen Folgen kommen **[Schönbeck et al., 1997]**. Eine solche Ruptur wird für 80% der tödlichen Myokardinfarkte bei Männern verantwortlich gemacht **[Davies, 2000]**. Sie tritt typischerweise in Regionen der Läsion mit anhaltender Entzündung, Makrophagenakkumulation und Apoptose auf, oft im Schulterbereich des Atheroms. Es kann jedoch auch infolge von oberflächlichen Verletzungen der Intima zur Ausbildung größerer Thromben kommen, da hier durch Freilegung von Kollagenfasern der Gefäßwand die intravasale Gerinnung initiiert wird **[Davies, 1990]**.

1.2 Inflammatorische Prozesse bestimmen auch den Verlauf kardialer Erkrankungen

Die Pathogenese und Prognose kardialer Erkrankungen wird, ähnlich wie die Atherogenese, ebenfalls durch inflammatorische Prozesse beeinflusst. Kardiale Verletzungen aktivieren das angeborene Immunsystem und initiieren inflammatorische Reaktionen **[Frangogiannis, 2008]**. Die häufigsten kardialen Verletzungen stellen Myokardischämien dar. Insbesondere in der akuten Postinfarkt-Phase kommt es über mechanische Deformation, ischämische Stimuli, reaktive Sauerstoffspezies und autokrine Regulationswege zu einer erhöhten Ausschüttung von Zytokinen wie TNF, IL-1 und IL-6. Diese modulieren neben der Rekrutierung zusätzlicher Entzündungszellen zum verletzten

Myokard auch postischämische kardiale Umbauprozesse. Kurzfristig beeinflussen sie das postischämische Überleben oder Absterben von Kardiomyozyten und modulieren die kardiale Kontraktilität. Anhaltend erhöhte Zytokinkonzentrationen scheinen zudem eine Umwandlung des Phänotyps der Kardiomyozyten zu begünstigen **[Nian et al., 2004]**.

Neben Kardiomyozyten sind auch andere ortsständige Zellen regulierend an lokalen Prozessen im kardialen Gewebe beteiligt. So stellt das kardiale Bindegewebe mit seinen zellulären Komponenten, wie beispielsweise den Fibroblasten, eine eigene dynamische metabolische Entität dar, welche ihre eigene Peptidhormon-Komposition und den Umsatz fibrillären Kollagens reguliert **[Weber et al., 1995]**. Fibroblasten sind auch maßgeblich an der Regulation der Wundheilung und Narbenbildung infolge eines Myokardinfarkts beteiligt. Postischämisch wurden Veränderungen des Migrations- und Adhäsionsverhaltens sowie der Kollagensynthese in Fibroblasten nachgewiesen **[Squires et al., 2005]**. Inwieweit diese auf inflammatorischen Interaktionen beruhen und welche Rolle Fibroblasten allgemein an der Vermittlung inflammatorischer kardialer Prozesse spielen, ist dabei gegenwärtig noch wenig untersucht.

Das kardiale Gewebe ist weiterhin von Immunzellen infiltriert, welche abhängig von lokalen inflammatorischen Stimuli über die Blutgefäße einwandern. Die Akkumulation von Immunzellen stellt dabei eine der ersten Reaktionen auf Verletzungen kardialen Gewebes dar **[Zlatanova et al., 2016]**. So kommt es beispielsweise im ischämischen Myokard zu einer deutlichen Hochregulation des MCP-1, welches mononukleäre Zellen (MNZ) ins Infarktareal rekrutiert **[Frangogiannis et al., 2002]**. MNZ scheinen zudem über eine gesteigerte IL-1 β -Sekretion nach Stimulation mit Harnsäurekristallen entscheidend an der Pathogenese der Gicht-assoziierten koronaren Herzkrankheit beteiligt zu sein **[Martinon et al., 2006, He et al., 2012]**. Für weitere kardiale Erkrankungen ist eine Zytokin-medierte inflammatorische Interaktion von MNZ mit Kardiomyozyten oder Fibroblasten anzunehmen.

Der Einfluss von Zytokinen auf kardiale Erkrankungen wurde bereits in einer Reihe von Veröffentlichungen untersucht. So scheinen IL-6 und IL-6-verwandte Zytokine in die Pathophysiologie der Herzinsuffizienz involviert und hierbei auch prognostisch bedeutsam zu sein **[Wollert und Drexler, 2001]**. Die Vermittlung der sepsisinduzierten myokardialen Dysfunktion wird entscheidend durch die inflammatorischen Zytokine TNF und IL-1 bestimmt **[Hunter und Doddi, 2010]**. Auch die kardiale Dysfunktion infolge autoimmuner Myokarditis scheint durch verschiedene Subpopulationen von Immunzellen und ihren Produkten vermittelt zu werden **[Afanasyeva et al., 2004]**. Eine Blockade der IL-1-Signalwege zeigte in Beobachtungsdaten, Pilotstudien und präklinischen Modellen eine förderliche Wirkung auf die Pathogenese kardialer Erkrankungen wie Atherosklerose, Atherothrombose, akuten Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz und Perikarditis **[Van Tassel et**

al., 2013]. Zudem wurde im Blutplasma von Patienten infolge eines Myokardinfarkts zunächst ein Anstieg der IL-1 β -Konzentration, gefolgt durch eine Spitze der IL-6-Konzentration nachgewiesen [Guillén et al., 1995], sodass vermutet werden kann, dass der postischämische IL-6-Anstieg IL-1-abhängig vermittelt wird. In Übereinstimmung dazu weist die aktuelle CANTOS-Studie darauf hin, dass die Reduzierung kardiovaskulärer Ereignisse durch Canakinumab, einen monoklonalen Antikörper gegen IL-1 β , über den IL-6-Signalweg vermittelt wird [Ridker et al., 2018].

1.3 Interleukin-6 (IL-6) ist ein wichtiger Mediator bei der Vermittlung inflammatorischer Prozesse kardiovaskulärer Erkrankungen

Im Rahmen der Atherogenese wird die Interaktion von Endothelzellen, eingewanderten Leukozyten und Gefäßmuskelzellen durch eine Vielzahl von Zytokinen vermittelt. Zahlreiche entzündungsassoziierte Signalproteine konnten so bereits als Biomarker für kardiovaskuläre Ereignisse identifiziert werden [Soeki und Sata, 2016]. Hierbei wird Interleukin-6 (IL-6) in diversen Veröffentlichungen eine Schlüsselrolle besonders hinsichtlich der Interaktion von angeborener und erworbener Immunität zugeschrieben [Jones, 2005]. In der vorliegenden Arbeit wurde IL-6 als Marker der inflammatorischen Aktivität in Zellkulturen gemessen. Im Folgenden soll daher genauer auf Herkunft, Signalwege und Funktionen von IL-6 eingegangen werden.

IL-6 wird beim Menschen auf Chromosom 7, Genolokus p21, verschlüsselt und zunächst als inaktive Vorstufe transkribiert [Sehgal et al., 1986]. Von dieser Vorstufe wird später das aktive IL-6 abgespalten. Der Aufbau des IL-6-Gens ist dabei über Speziesgrenzen hinweg im Genom konserviert. Das wurde beispielhaft durch Klonierung und Sequenzierung des IL-6-Gens von Menschen [Zilberstein et al., 1986], Mäusen [Tanabe et al., 1988] und Ratten [Northemann et al., 1989] nachgewiesen.

IL-6 kann zum einen an den membrangebundenen IL-6-Rezeptor (IL-6R) binden, welcher hauptsächlich von Hepatozyten und einigen Leukozyten, darunter Monozyten bzw. Makrophagen, exprimiert wird [Jones et al., 2001]. Die intrazelluläre Signalkaskade wird hierbei mithilfe des rezeptorassoziierten, signaltransduzierenden Glykoproteins gp130 vermittelt. Zum anderen kann IL-6 ebenfalls einen in zahlreichen Körperflüssigkeiten vorkommenden löslichen IL-6-Rezeptor (sIL-6R) binden. Der hieraus hervorgehende IL-6/sIL-6R-Komplex wiederum kann infolge membranständiges gp130 binden, welches auf allen Körperzellen vorkommt, und dieses aktivieren. Dieser Vorgang wird als „*trans-signaling*“ bezeichnet [Rose-John, 2012]. In beiden Fällen folgt auf die Aktivierung des membranständigen gp130 die Aktivierung des JAK/STAT-(*Janus kinase/Signal transducer and activator of transcription*)- und MAPK-(*Mitogen-activated protein kinase*)-Signalweges. Daraufhin wird schließlich die Transkription ausgewählter Zielgene initiiert

[Heinrich et al., 2003].

IL-6 vermittelt eine weite Bandbreite biologischer Funktionen in unterschiedlichen Geweben **[Kishimoto et al., 1995; Heinrich et al., 1990]**. Im Folgenden sollen einige davon exemplarisch Erwähnung finden. Über differenzierte Regulierung unterschiedlicher Leukozytenpopulationen hinsichtlich ihrer Rekrutierung, Aktivierung und Apoptose ist IL-6 als entscheidender Vermittler des Übergangs von angeborener hin zur erworbenen Immunität identifiziert worden **[Jones, 2005]**. So wird im Rahmen einer akuten Entzündung die Beseitigung der primär infiltrierenden neutrophilen Granulozyten und die folgende lokale Anreicherung mononukleärer Zellen (MNZ) mittels „*trans-signaling*“ durch IL-6 reguliert **[Hurst et al., 2001; Kaplanski et al., 2003]**. Auch die Differenzierung der MNZ in Richtung ortständiger Makrophagen wird IL-6-abhängig forciert **[Mitani et al., 2000; Chomarat et al., 2000]**. Über „*trans-signaling*“ wird zudem die Apoptose neutrophiler Granulozyten gefördert **[McLoughlin et al., 2003]**, wohingegen der Apoptose-Eintritt von T-Lymphozyten durch IL-6 gehemmt wird **[Narimatsu et al., 2001]**. Weiterhin ist IL-6 über die Förderung der Proliferation multipotenter Vorläuferzellen in die hämatopoetische Nachbildung von Blutzellen involviert **[Sui et al., 1995]**. Zudem wurde auch ein Einfluss von IL-6 auf die Proliferation **[Kishimoto et al., 1995]** und Migration **[Wang und Newman, 2003]** glatter Gefäßmuskelzellen beobachtet. Weiterhin ist die entscheidende Rolle von IL-6 für die hepatozytäre Synthese von Akut-Phase-Proteinen wie C-reaktives Protein (CRP), Fibrinogen und Amyloid A seit langem bekannt **[Kishimoto, 1989]**. Neben der Plasmakonzentration von CRP, Procalcitonin und Interleukin-8 hat sich der IL-6-Plasmaspiegel, dessen Anstieg einem CRP-Plasmaspiegel-Anstieg vorausgeht, mittlerweile aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit als wertvoller Parameter zur raschen Beurteilung akuter septischer Krankheitsbilder in der Intensivmedizin etabliert **[Harbarth et al., 2001]**.

In prospektiven klinischen Studien hat sich die IL-6-Serumkonzentration als starker eigenständiger Prognosefaktor für das Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen erwiesen **[Cesari et al., 2003]**. Erhöhte IL-6-Plasmakonzentrationen waren weiterhin mit einem signifikant erhöhten Risiko zukünftiger Myokardinfarkte assoziiert **[Ridker et al., 2000]**. Immunhistochemisch konnte eine vermehrte Expression von IL-6 im Schulterbereich atherosklerotischer Plaques sowie im rupturverdächtigen Bereich atherosklerotischer Plaques von Patienten mit instabiler *Angina pectoris* nachgewiesen werden **[Schieffer et al., 2000]**. Über Aktivierung der Akute-Phase-Reaktion und der daraus resultierenden proinflammatorischen Signalkaskade wirkt IL-6 auch auf frühere Phasen der Plauegenese ein. Dass zirkulierendes IL-6 weiterhin über Stimulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse auch mit der Entwicklung zentralen Übergewichts, Bluthochdrucks und Insulinresistenz assoziiert werden kann, lässt IL-6 eine Schlüsselrolle in der Pathogenese koronarer Herzerkrankungen zukommen **[Yudkin et al., 2000]**.

Postischämisch scheint IL-6 insbesondere die Kollagenformation sowie die Kardiomyozytenproliferation und damit das *Remodeling* im Infarktgebiet zu regulieren [Puhakka et al., 2003; Han et al., 2015]. Verschiedene klinische und experimentelle Daten deuten zudem klar darauf hin, dass IL-6 und IL-6-verwandte Zytokine in die Pathophysiologie der Herzinsuffizienz involviert sind. Sie sind dabei sowohl an der Regulation der Hypertrophie, als auch der Apoptose von Kardiomyozyten beteiligt und liefern zudem wichtige prognostische Informationen [Wollert und Drexler, 2001]. Ferner wurde nachgewiesen, dass IL-6 auch am nicht vorgeschädigten Herzen einen Phänotyp induziert, welcher stark dem der hypertensiven Kardiomyopathie ähnelt [Meléndez et al., 2010].

1.4 Kokulturmodelle zeigen zelluläre inflammatorische Interaktionen zwischen Gefäßmuskelzellen und mononukleären Zellen auf

Interaktionen zwischen Zellen der Gefäßwand und eingewanderten Monozyten scheinen die lokalen inflammatorischen Prozesse zu beeinflussen. Durch die Produktion von Zytokinen, die Reaktionen auf diese potenten Zellaktivatoren und Zytokin-vermittelte Interaktionen mit eingewanderten Zellen wie Monozyten, T-Zellen oder Mastzellen sind Gefäßmuskelzellen (GMZ) und andere Zellen der Gefäßwand aktiv am inflammatorischen Netzwerk beteiligt [Loppnow et al., 2008].

Kokultursysteme stellen einen geeigneten Ansatz dar, um spezifische molekulare Mechanismen zwischen den Zellen zu studieren. Die Interaktionen von GMZ und Monozyten bzw. Makrophagen wurden bereits in einer Vielzahl von Kokulturmodellen untersucht [Zuniga et al., 2014]. In Kokulturen humaner GMZ und THP-1-Zellen, einer humanen monozytenartigen Zelllinie, zeigte sich eine erhöhte Produktion von Matrix-Metalloproteinase-1 (MMP-1), welches eine entscheidende Rolle bei der Ruptur atherosklerotischer Plaques spielt [Zhu et al., 2000]. Im gleichen Kokulturmodell wurde ebenfalls eine erhöhte Produktion von *vascular endothelial growth factor* (VEGF) im Vergleich zu den Monokulturen von GMZ und THP-1-Zellen nachgewiesen [Hojo et al., 2000], wobei diese lokale VEGF-Produktion Atherogenese und vaskuläres *Remodeling* entscheidend zu beeinflussen scheint. In beiden Fällen war IL-6 an der Vermittlung der zellulären Interaktion von GMZ und Monozyten beteiligt, welche zu einer vermehrten Produktion von VEGF bzw. MMP-1 führte. Der Einfluss von IL-6 auf die Atherogenese lässt sich somit auch auf der Ebene zellulärer Interaktionen mithilfe von Kokulturmodellen belegen.

Weiterhin wurde auch die Sekretion von IL-6 selbst in Kokulturen näher untersucht. In durch Lipopolysaccharid (LPS), einem Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien, stimulierten Kokulturen humaner GMZ mit Mononukleären Zellen (MNZ) oder Monozyten

zeigte sich eine synergistische, also überadditive, Produktion von MCP-1 und IL-6 [Chen et al., 2009]. Dieser Synergismus war abhängig von dem Verhältnis von GMZ zu MNZ bzw. Monozyten in den Kokulturen. Vermittelt wurde die synergistische IL-6-Produktion durch Zytokine wie IL-1. Eine gleichzeitige Hemmung der IL-1-, IL-6- und TNF-Signalwege bewirkte die komplette Unterdrückung des Synergismus. In Kokulturen humaner GMZ mit einer LPS-stimulierten humanen monozytenartigen Zelllinie (U937) wurden ebenfalls gesteigerte Mengen an IL-6 nachgewiesen [Butoi et al., 2011]. Getrennte Genexpressionsanalysen der beiden Zelltypen nach Abschluss der Kokultivierung zeigten hier zudem eine Hochregulierung der IL-6-mRNA in den GMZ. Auch Stimulation mit 25-Hydroxycholesterol, einem Oxidationsprodukt des endogenen Cholesterols, führte in Kokulturen humaner GMZ und Monozyten zu einer synergistischen IL-6-Produktion [Fu et al., 2014]. Diese wurde ebenfalls durch IL-1 vermittelt.

1.5 Kulturversuche zeigen die inflammatorische Aktivität von Kardiomyozyten

Inflammatorische Prozesse bestimmen die Pathogenese und Prognose kardialer Erkrankungen. In Zellkulturversuchen wurde zudem nachgewiesen, dass stimulierte Kardiomyozyten selbst inflammatorische Zytokine sezernieren können. So wurden ventrikuläre Kardiomyozyten isoliert und mit TNF, IL-1 β , LPS sowie prä- und postischämischer Lymphe stimuliert. Dabei zeigten unstimulierte Kardiomyozyten keine signifikante IL-6-mRNA-Expression. Mit präischämischer Lymphe stimulierte Kardiomyozyten zeigten eine minimale oder keine IL-6-mRNA-Sekretion, wohingegen mit TNF, IL-1 β , LPS oder postischämischer Lymphe stimulierte Kardiomyozyten eine starke Induktion der IL-6-mRNA zeigten [Gwechenberger et al., 1999].

Auch war in den Überständen neonataler Rattenkardiomyozyten eine gesteigerte IL-6-Sekretion nach LPS-Stimulation nachweisbar, sowie auch eine Steigerung von zellassoziertem IL-1 [Müller-Werdan et al., 1998; Westphal et al., 2007]. LPS-Stimulation führte in Kardiomyozyten ebenfalls zu einem Anstieg der TNF-Sekretion [Zhang und Feng, 2010]. TNF-Stimulation wiederum induzierte eine gesteigerte IL-6-Sekretion in neonatalen Rattenkardiomyozyten [Müller-Werdan et al., 1997], was die Vermittlerrolle von TNF in der sepsisinduzierten myokardialen Dysfunktion unterstreicht. Der Einfluss weiterer potentieller Stimuli auf Kardiomyozyten ist hingegen derzeit noch wenig untersucht. Beispielsweise gehören sowohl Palmitinsäure [Soto-Vaca et al., 2013], eine im Blut zirkulierende freie Fettsäure, als auch 25-Hydroxycholesterol zu den bekannten kardiovaskulären Risikofaktoren, welche die Sekretion proinflammatorischer Zytokine in GMZ [Wu et al., 2014] bzw. Kokulturen von GMZ und Monozyten [Fu et al., 2014] induzieren. Untersuchungen, in denen kardiale Zellen durch Palmitinsäure oder 25-Hydroxycholesterol stimuliert werden, stehen aktuell noch aus.

Wenig untersucht ist bislang ebenfalls, inwieweit andere ortsständige Zellen wie kardiale Fibroblasten oder eingewanderte Immunzellen wie MNZ an inflammatorischen Prozessen im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen beteiligt sind. Zelluläre Interaktionen im kardialen Gewebe könnten lokale entzündliche Prozesse weiterhin beeinflussen. Kokulturversuche, anhand derer die zellulären Interaktionen von Kardiomyozyten bzw. kardialen Fibroblasten mit MNZ näher untersucht werden könnten, stehen bislang allerdings noch aus.

2 Zielstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob, ähnlich wie bereits in humanen Zellkulturen beobachtet, zwischen murinen kardiovaskulären Zellen und Immunzellen Interaktionen in Kokulturmodellen bestehen, welche zur Produktion von Inflammationsmediatoren (Zytokinen) führen. Dazu wurde die Sekretion von Interleukin-6 (IL-6) in humanen bzw. murinen Kokulturen von Gefäßmuskelzellen, Kardiomyozyten bzw. kardialen Fibroblasten mit mononukleären Zellen verglichen. Untersucht wurde hierbei, inwieweit exogene Stimuli wie Lipopolysaccharid (LPS), endogene Stimuli wie 25-Hydroxycholesterol (Chol), Palmitinsäure oder Harnsäurekristalle bzw. inflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF) oder IL-1 die IL-6-Sekretion der Kokulturen beeinflussen. Zudem wurde die Funktion von IL-1 als Vermittler der zellulären Interaktionen in den eingesetzten Kokulturmodellen untersucht. Schließlich wurde geprüft, ob homologe humane, heterologe und homologe murine Kokulturmodelle vergleichbare Ergebnisse hervorbringen und inwieweit murine Modelle damit eine geeignete Grundlage zukünftiger mechanistischer Untersuchungen beispielsweise mit transgenen Tieren darstellen könnten.

Basierend auf den Ergebnissen der vorhergehenden Studien unserer Arbeitsgruppe der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III wurden daher die folgenden Fragestellungen und Hypothesen entwickelt:

1. Ist die in früheren Studien beschriebene synergistische IL-6-Sekretion für humane Gefäßmuskelzellen in Kokultur mit humanen mononukleären Zellen im Rahmen dieser Arbeit reproduzierbar?
2. Zeigen murine kardiovaskuläre Zellen wie Gefäßmuskelzellen, Kardiomyozyten und Fibroblasten in Kokultur mit mononukleären Zellen ebenfalls eine synergistische IL-6-Sekretion?
3. Sollte ein derartiger Synergismus vorliegen: Wird die zelluläre Interaktion durch IL-1 vermittelt?
4. Können neben Lipopolysaccharid auch andere Stimuli eine verstärkte IL-6-Sekretion in Kokultur bewirken?
5. Können rein murine Kokulturmodelle von kardiovaskulären Zellen und mononukleären Zellen etabliert werden?

3 Material und Methoden

3.1 Zellkulturmaterialien und Medien

Die verwendeten Substanzen und Materialien wurden von nachfolgend genannten Firmen bezogen: Zellkulturschalen sowie 25 cm²-, 75 cm²- und 175 cm²-Zellkulturflaschen wurden über die Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen) erworben. Weiterhin fanden für die Kultivierung neonataler Rattenkardiomyozyten 175 cm²-Kulturflaschen der Firma BD Biosciences (Heidelberg) Verwendung. Von dieser Firma wurden ebenfalls Zellfilter (Porengröße 70 µm) und 24-Loch-Platten bezogen. 96-Loch-Platten wurden über TPP Techno Plastic Products AG (Trasadingen, Schweiz) erworben und Mikroreaktionsgefäße über Eppendorf AG (Hamburg). Von der Biochrom GmbH (Berlin) kamen RPMI-(*Roswell Park Memorial Institute*)-1640-Medium (*very low endotoxin*), CMRL-(*Connaught Medical Research Laboratories*)-1415-Trockenmedium, DMEM-(*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)-Medium (mit 1 g/l D-Glukose), L-Glutamin (200 mM), Penicillin / Streptomycin (10.000 IE / 10.000 µg/ml), PBS (*Phosphate-buffered saline*), Biocoll-Trennlösung, Kollagenase, Pferdeserum und FKS (fetales Kälberserum) zur Anwendung. BSA (bovines Serumalbumin, A8412) wurde, wie auch 25-Hydroxycholesterol (Chol) und Palmitinsäure, von der Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) bezogen. Interleukin-1α (IL-1α), IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1-RA) und Tumornekrosefaktor-α (TNF) stammen von Cell Concepts (Umkirch). Lipopolysaccharid (LPS) von *Salmonella enterica* serovar friedena wurde freundlicherweise durch Prof. Dr. H. Brade (FZ-Borstel, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Alle übrigen Lösungen und Chemikalien wurden von der Peprotech GmbH (Hamburg), Merck (Darmstadt), BD Biosciences (Heidelberg) und Ratiopharm (Ulm) erworben.

Die Rezeptur einiger in der vorliegenden Arbeit häufig eingesetzter Nährmedien wird im Folgenden wiedergegeben. Die Zusammensetzung weiterer eingesetzter Medien und Lösungen wird dann an entsprechender Stelle im Verlauf beschrieben.

CMRL-Grundmedium (pH=7,4)

Zusatz der folgenden Substanzen zu *Aqua ad iniectabilia*

- 2,35 g/l CMRL-1415-Trockenmedium
- 135,00 mM Natriumchlorid
- 10,00 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
- 7,50 mM D-Glukose
- 3,50 mM Kaliumchlorid
- 1,40 mM Na₂HPO₄
- 1,30 mM Calciumchlorid
- 0,97 mM Magnesiumsulfat
- 0,36 mM NaH₂PO₄

CMRL-Wachstumsmedium (pH=7,4)

- . 80 ml CMRL-Grundmedium
- . 10 ml Pferdeserum
- . 10 ml FKS
- . 40 mg/l Gernebcin

Kulturmedium 1 (synthetisches CMRL-Medium; pH=7,4)

Zusatz der folgenden Substanzen zum CMRL-Grundmedium

- . 25 mg/l Albumin
- . 25 mg/l Insulin
- . 25 mg/l Transferrin
- . 40 mg/l Gernebcin

Kulturmedium 2

Zusatz der folgenden Substanzen zum RPMI-1640-Medium

- . 10 % FKS
- . 1 % Antibiotika
- . 1 % L-Glutamin

Kulturmedium 3

Zusatz der folgenden Substanzen zum DMEM-Medium (mit 1 g/l D-Glukose)

- . 10 % FKS
- . 1 % Antibiotika
- . 1 % L-Glutamin

3.2 Zellen

In der hier vorgestellten Arbeit fanden verschiedene humane wie auch murine Primärzellen Verwendung, deren Isolierung und Kultivierung folgend erläutert wird. Humane Gefäßmuskelzellen (GMZ) wurden aus Gefäßen isoliert und kultiviert, welche im Rahmen von Bypass-Operationen entnommen und dem Labor für Kardiologie freundlicherweise durch die Herz-Thorax-Chirurgie des UKH zur Verfügung gestellt wurden. Humane mononukleäre Zellen (MNZ) wurden aus *Buffy Coat* isoliert, welcher dankenswerterweise durch die Abteilung für Transfusionsmedizin des UKH bereitgestellt wurde. Die Nutzung der humanen GMZ und MNZ wurde durch die Ethikkommission der Fakultät gestattet. Die Organentnahme zur Isolierung neonataler Rattenkardiomyozyten (nRKM), kardialer Fibroblasten (Fib), Aorta-GMZ und MNZ der Wistar ratte sowie Aorta-GMZ der C3H-Maus wurde im Rahmen der genehmigten Versuchsvorhaben K6 III A4 und K6 III M7 durchgeführt.

3.2.1 Isolierung und Kultivierung humaner Gefäßmuskelzellen

Humane GMZ wurden kultiviert aus Gefäßen, welche im Rahmen von Bypass-Operationen entnommen wurden. Bei der Aufarbeitung der Gefäße wurden zunächst kleine Stücke der Gefäßmuskelschicht auf den Boden von Petrischalen aufgebracht, mit Kulturmedium 3 (siehe 3.1) bedeckt und bei 7,5 % CO₂ inkubiert. Wenn nach einigen Tagen GMZ aus den Gewebestücken ausgewachsen waren, erfolgte nach Trypsinierung die Überführung in 25 cm²-Kulturflaschen (3500 GMZ pro cm²). Auf die gleiche Weise wurden die GMZ in 75 cm²- und später mehrere Generationen lang in 175 cm²-Kulturflaschen kultiviert. Die Aussaat von humanen GMZ in 24-Loch-Platten für Kokulturversuche erfolgte in einer Konzentration von 10.000 GMZ pro cm² in Kulturmedium 3.

3.2.2 Isolierung und Kultivierung muriner Gefäßmuskelzellen

Murine GMZ wurden aus der Aortenwand von C3H-Mäusen bzw. Wistarratten isoliert. Die Maus-Aorten-GMZ wurden dabei durch die Laborassistentinnen ausgehend von in Stickstoff gelagerten Zellen in Kultur gebracht. Die GMZ von Wistarratten wurden in einem vergleichbaren Verfahren wie oben bereits für humane GMZ beschrieben aus den Aorten der Ratten isoliert und kultiviert. Als Medium wurde für alle murinen GMZ Kulturmedium 3 eingesetzt (vgl. 3.2.1). Die Einsaat der GMZ in 24-Loch-Platten erfolgte in einer Konzentration von 10.000 GMZ pro cm² und die Inkubation der Zellen bei 7,5 % CO₂.

3.2.3 Isolierung und Kultivierung neonataler Rattenkardiomyozyten und kardialer Fibroblasten

Zur Isolierung und Kultivierung der Ratten-Herzzellen wurden pro Versuch zwischen 50 und 70 neonatale Wistarratten mit einem maximalen Alter von drei Tagen verwendet. Eine Genehmigung zur Durchführung der Organentnahmen lag vor (siehe oben). Die Isolierung der Herzzellen erfolgte gemäß der im Folgenden beschriebenen Methode [**Werdan und Erdmann, 1989**] durch die medizinisch-technischen Laborassistentinnen der Klinik.

Die Tiere wurden zunächst mittels Pinzette durch Genickbruch getötet, anschließend zur Desinfektion kurz in 70 %-iges Ethanol getaucht und an den Extremitäten fixiert. Daraufhin wurde der Thorax über einen Skalpellschnitt geöffnet und das noch schlagende Herz mithilfe einer sterilen Pinzette entnommen und in eine auf Eis gelagerte Petrischale mit PBS-Lösung + 5 mM Glukose (pH 7,4) überführt. Die entnommenen Herzen wurden anschließend mittels Skalpell in kleine Stücke geschnitten. Diese Stücke wurden in ein Becherglas mit 10 ml Trypsinierungslösung (PBS + 5 mM Glukose + 0,12 % Trypsin + 0,03 % Kollagenase) überführt und 15 Min. bei 37 °C im CO₂-Brutschrank mittels

Magnetrührer gerührt. Der aus diesem ersten Trypsinierungsschritt resultierende Überstand enthielt zahlreiche Zellfragmente, Blutkörperchen und Bindegewebszellen und wurde verworfen. In zehn weiteren Trypsinierungsschritten wurden je 5 ml Trypsinierungslösung zu den Gewebestücken zugegeben und die Suspension anschließend für weitere 10 Min. im Brutschrank gerührt. Hiernach wurden die Überstände in Gewebekulturröhrchen überführt, die je 2 ml CMRL-Wachstumsmedium (siehe 3.1) enthielten, und auf Eis gekühlt. Bei Raumtemperatur wurden die Röhrchen 10 Min. zentrifugiert (1400 rpm), die Überstände anschließend verworfen und die Zell-Pellets in je 5 ml CMRL-Wachstumsmedium resuspendiert. Aus dieser Zellsuspension wurden daraufhin durch Filtration mit Hilfe eines Filters der Porengröße 70 μm Gewebereste und Zellklumpen abgetrennt und die resuspendierten Herzzellen in einer Gewebekulturflasche (175 cm^2) gesammelt. In dieser Kulturflasche wurde die Zellsuspension anschließend 1,5 Std. bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Zeitspanne war der Großteil der vormals in Suspension befindlichen Fibroblasten (Fib) gemäß der „*differential attachment technique*“ [Salameh und Dhein, 2005] am Boden der Kulturflasche adhäriert, wohingegen die neonatalen Rattenkardiomyozyten (nRKM) noch nicht adhäriert waren und somit durch Entnahme des Überstandes in ein Becherglas überführt werden konnten. Die Zellkonzentration dieser Suspension wurde nun mit Hilfe der Trypanblau-Färbung in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt, sodass die nRKM in einer Konzentration von 120.000 Zellen pro cm^2 in CMRL-Wachstumsmedium in 24-Loch-Platten eingebracht werden konnten. Die nRKM wurden 24 Std. bei 37 °C inkubiert. Im Laufe dieser Inkubationsdauer adhärierten die nRKM am Plattenboden und fingen spontan an zu kontrahieren, was am Folgetag unter Zuhilfenahme eines mit einer Wärmekammer ausgestatteten Mikroskops stichprobenartig geprüft wurde. Hiernach wurde das CMRL-Wachstumsmedium aus den Löchern abgesaugt und der Zellrasen durch zweifaches vorsichtiges Waschen (je 0,5 ml synthetisches CMRL-Medium (Kulturmedium 1, siehe 3.1) pro Loch) von nicht adhärenen Zellfragmenten befreit. Die Kulturen wurden anschließend in das serumfreie Kulturmedium 1 überführt, wodurch die Vermehrung von kontaminierenden Fib unterbunden werden sollte. Die nRKM-Kulturen wurden bei 37 °C weiter inkubiert.

Auch die in der Kulturflasche adhärierten Fib wurden in einigen Experimenten genutzt. Hierfür wurde der Zellrasen der Kulturflasche am Präparationstag zweimal mit Medium gespült und nach Zugabe von Kulturmedium 2 (siehe 3.1) 24 Std. bei 7,5 % CO_2 und 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurden die Fib trypsiniert und in einer Konzentration von 10.000 bzw. 30.000 Zellen pro cm^2 in 24-Loch-Platten eingesät.

3.2.4 Isolierung humaner mononukleärer Zellen aus *Buffy Coat*

Die Isolierung humaner MNZ erfolgte aus *Buffy Coat*, einem Nebenprodukt bei der

Herstellung von Erythrozytenkonzentrat aus Vollblutspenden. Die *Buffy Coats* für die Versuche dieser Arbeit wurden freundlicherweise durch das Zentrum für Transfusionsmedizin des UKH Kröllwitz zur Verfügung gestellt. Bei der Aufarbeitung der *Buffy-Coats* (70 bis 100 ml) wurden diese zunächst etwa im Verhältnis 1:2 mit raumtemperiertem PBS + 0,08 % Heparin verdünnt. Diese Lösung wurde anschließend auf vier Glasröhrchen aufgeteilt und vorsichtig über die darin bereits vorgelegte Biocoll-Trennlösung geschichtet. Im Anschluss erfolgte der erste Zentrifugationsschritt (30 Min., 400 x g, Acc 1, Dec 1, 20 °C), wobei die Blutbestandteile entsprechend ihrer Dichte aufgetrennt wurden. Am Ende dieser Zentrifugation waren in den Glasröhrchen mehrere Schichten voneinander abgrenzbar (von oben nach unten: thrombozytenreicher Plasmaüberstand, MNZ-haltiger Ring, Biocoll-Trennlösung, Granulozyten und Erythrozyten). Zunächst wurde der Plasmaüberstand abgesaugt. Anschließend wurde der MNZ-haltige Ring eines jeden Röhrchens abpipettiert und in ein weiteres Zentrifugationsröhrchen mit vorgelegtem serumfreiem Medium (RPMI-1640-Medium + 1 % Antibiotika + 1 % L-Glutamin) überführt. Diese vier Röhrchen wurden nun bis zu einer einheitlichen Füllhöhe aufgefüllt und die isolierten MNZ anschließend in zwei Zentrifugationsschritten (je 10 Min., 200 x g, Acc 9, Dec 3, 20 °C) gewaschen. Nach dem ersten Waschschrift wurde der zellfreie Überstand in allen Röhrchen verworfen, die Zellpellets wurden zunächst in serumfreiem Medium resuspendiert und die Röhrchen anschließend wieder einheitlich aufgefüllt. Im Anschluss an den zweiten Zentrifugationsschritt wurden die resuspendierten MNZ aller vier Röhrchen gesammelt und die MNZ-Zellsuspension bis zur Einbringung in die Kokultur auf Eis gelagert. Die Bestimmung der Zellkonzentration erfolgte durch Färbung mit Türk'scher Lösung und Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer. Abschließend wurden die isolierten humanen MNZ in der gewünschten Konzentration in die Kokulturansätze in 24-Loch-Platten eingebracht.

3.2.5 Isolierung muriner mononukleärer Zellen aus Rattenblut

Das zur Isolierung von Ratten-MNZ eingesetzte Rattenblut wurde durch das Zentrum für Angewandte Medizinische und Humanbiologische Forschung (ZAMED) des UKH mittels Herzpunktion gewonnen. Das Isolierungsverfahren für Ratten-MNZ wurde an die kleineren Blutmengen der Ratten angepasst, ansonsten aber in gleicher Weise durchgeführt wie im Fall der humanen MNZ.

3.3 Durchführung der Kokulturversuche

Insgesamt 17 Kokulturversuche sind für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt worden. Hierfür wurden humane und murine GMZ bzw. murine Herzzellen gemeinsam mit MNZ humanen bzw. murinen Ursprungs inkubiert und stimuliert.

Anschließend wurden die Überstände der Ansätze entnommen und auf ihren Interleukin-6-Gehalt hin getestet. Alle Kokulturversuche folgten dabei einem einheitlichen zeitlichen Ablauf (schematisch dargestellt in Abbildung 1).

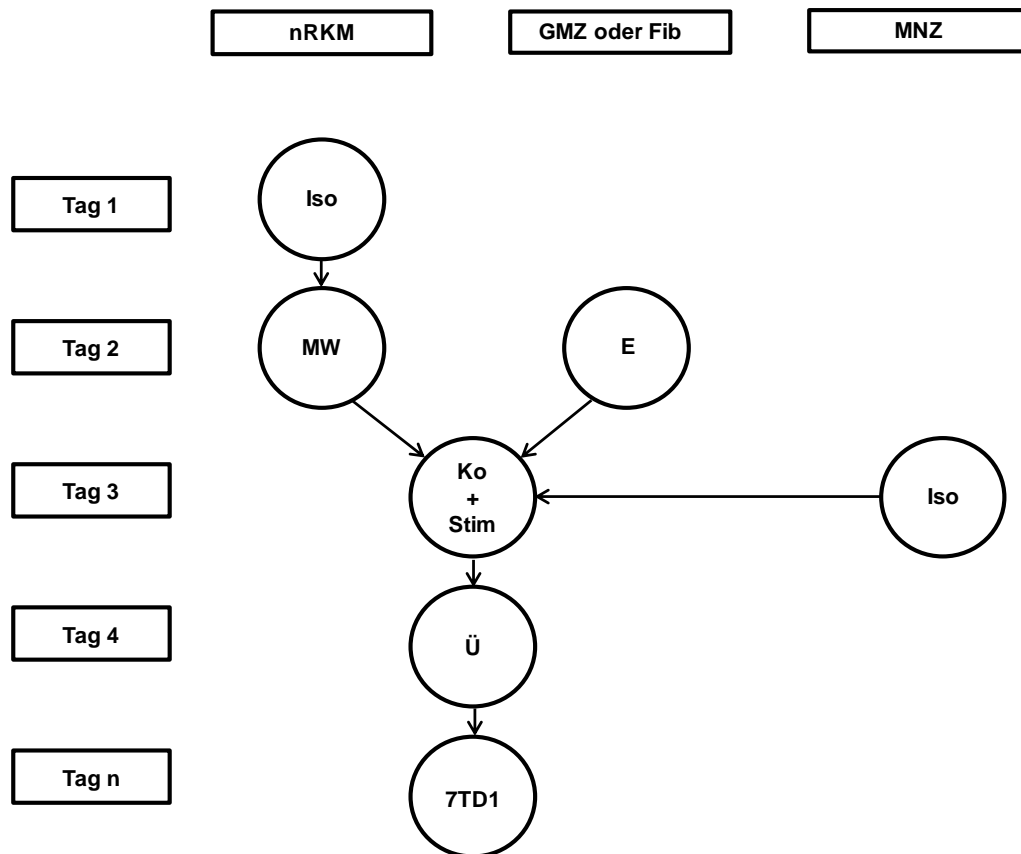


Abbildung 1: Ablauf der Kokulturversuche. An Tag 1 erfolgte die Isolierung (Iso) und Kultivierung der Rattenkardiomyozyten in CMRL-Wachstumsmedium. An Tag 2 wurden die Kardiomyozytenkulturen mehrfach vorsichtig gespült und in synthetisches CMRL-Medium (Kulturmedium 1) überführt (MW). Gefäßmuskelzellen bzw. Fibroblasten wurden ebenfalls an Tag 2 in Kulturmedium 3 bzw. 2 eingesät (E). Anschließend wurden alle Ansätze 24 Std. inkubiert. An Tag 3 erfolgte die Isolation der benötigten mononukleären Zellen aus *Buffy Coat* bzw. Vollblut von Wistarratten. Die frisch isolierten MNZ wurden in Kulturmedium 2 mit den Kardiomyozyten, Gefäßmuskelzellen bzw. Fibroblasten in Kokultur (Ko) gebracht, gegebenenfalls unter Zugabe von Stimuli (Stim). Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Überstände (Ü) der Kokulturansätze an Tag 4 abgenommen und bei -20 °C aufbewahrt. Der 7TD1-Bioassay (7TD1) zur Bestimmung der IL-6-Aktivität in den Überständen wurde an einem beliebigen Folgetag durchgeführt.

Vor Zugabe von MNZ bzw. Stimuli zu den Kulturen wurde mikroskopisch in allen Löchern überprüft, dass die Fib und GMZ zu einem gleichmäßigen Zellrasen gediehen waren und

die nRKM spontan kontrahierten. Die Kokulturversuche wurden in 24-Loch-Platten (1 ml Füllvolumen pro Loch) durchgeführt. Beim Ansetzen der Kokulturen wurde zunächst das alte Medium verworfen, daraufhin wurden alle Löcher vorsichtig zweifach mit serumfreiem Medium (RPMI-1640-Medium + 1 % Antibiotika + 1 % L-Glutamin) gespült, um Zellfragmente und apoptotische Zellen aus den Ansätzen zu entfernen. Hiernach wurde Kulturmedium 2 in jedes Loch vorgelegt, um ein Austrocknen der am Plattenboden adhären nRKM, Fib und GMZ zu verhindern. Abschließend wurden MNZ und Stimulantien in der erwünschten Konzentration zugegeben. Als Stimulantien kamen in den Experimenten zum Einsatz: LPS, 10 pg/ml bis 1 µg/ml; IL-1 α , 1 bzw. 10 ng/ml; IL-1-RA, 300 ng/ml; Chol, 10 bzw. 50µg/ml; TNF, 10 bzw. 50 ng/ml; Harnsäure, 10 bzw. 100 µg/ml; Palmitinsäure, 100 µM. Die eingesetzten Versuchsbedingungen sind den jeweiligen Legenden zu entnehmen. Nach dem Ansetzen der Kokulturen wurden die Platten 24 Std. inkubiert (7,5 % CO₂). Am Folgetag wurden die Überstände aus den Löchern der Platten abgenommen und zentrifugiert (10 Min., 500 rpm, 4 °C). Hiervon wurden anschließend je 0,9 ml zellfreier Überstand in Mikroreaktionsgefäße überführt und bei -20 °C gelagert.

3.4 Nachweismethoden von Interleukin-6 in den Zellkultur-Überständen

Als Maß für die inflammatorische Aktivität wurde in den Überständen der Kulturen der IL-6-Gehalt bestimmt. Um hierbei die Kokulturmodelle mit murinen und humanen Zellen vergleichen zu können, fand die Messung mit Hilfe eines Bioassays statt, welcher IL-6 unterschiedlicher Spezies detektiert. Vorab erfolgte ein Vergleich der Messergebnisse des Bioassays mit den Ergebnissen, die über *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA), der Standardmessmethode der früheren Versuche, erlangt wurden. Im Folgenden werden beide Testverfahren erläutert.

3.4.1 Messung der IL-6-Aktivität mittels 7TD1-Bioassay

Zur Bestimmung der biologischen IL-6-Aktivität wurde die IL-6-abhängige murine B-Zelllinie 7TD1 verwendet [Van Snick et al., 1986]. 7TD1-Zellen verwenden dabei durch unterschiedliche Spezies sezerniertes IL-6 und können so in homologen humanen und murinen sowie in heterologen Kokulturversuchen eingesetzt werden. Für den Zeitraum der in dieser Arbeit dargestellten Versuche wurden die 7TD1-Zellen in Dauerkultur gebracht und aufgrund ihrer hohen Teilungsrate dreimal pro Woche in 25 cm²-Kulturflaschen subkultiviert. Nach mikroskopischer Kontrolle der Zellkultur wurden bei jedem Subkultivierungsschritt 400.000 7TD1-Zellen in 8 ml 7TD1-Kultivierungsmedium (RPMI-1640-Medium + 10 % FKS + 1 % Antibiotika + 1 % L-Glutamin + IL-6 (100 pg/ml) + 50 µM β -Mercaptoethanol) überführt. Die Inkubation der 7TD1-Zellen erfolgte bei 37 °C und 7,5 % CO₂.

Für den Bioassay zur Bestimmung der IL-6-Aktivität in den Überständen der Zellkulturen wurden 96-Loch-Platten verwendet. Zunächst wurde in jedes Loch 7TD1-Verdünnungsmedium (50 µl; RPMI-1640-Medium + 1 % Antibiotika + 1 % L-Glutamin + 2 % FKS) vorgelegt. Anschließend wurden 17 µl Probe bzw. IL-6-Standardlösung (10 ng/ml IL-6) in die oberste Zeile der Platten aufgetragen. Die eingebrachten Proben bzw. die Standardlösung wurden im Verdünnungsverhältnis 1:4 schrittweise bis zur untersten Zeile verdünnt. In Kokultur einfach angesetzte Versuchsbedingungen wurden dabei als Dreifachbestimmung (Triplikate) angelegt, wohingegen Bedingungen, die doppelt in der Kokultur angesetzt worden waren, durch zweifachen Probenauftrag im Bioassay insgesamt vierfach bestimmt wurden (Quadruplikate). Die Standard-IL-6-Lösung wurde in jedem Bioassay als Quadruplikat aufgetragen.

Die zur Detektion eingesetzten 7TD1-Zellen wurden vor ihrem Einsatz im Bioassay dreimal zentrifugiert (10 Min., 800 rpm, 20 °C) und nach jeder Zentrifugation in IL-6-freiem Medium (RPMI-1640-Medium + 1 % Antibiotika + 1 % L-Glutamin) resuspendiert, um IL-6-Reste der Zellkultur auszuwaschen. Nach der Zellzählung mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer wurden 30.000 7TD1-Zellen pro ml in RPMI-1640-Medium + 1 % Antibiotika + 1 % L-Glutamin + 18 % FKS + 0,2 % β-Mercaptoethanol gegeben. Von dieser Zellsuspension wurden 50 µl in jedes Loch pipettiert, sodass eine Anzahl von 1500 7TD1-Zellen pro Loch resultierte. Anschließend wurden die Platten 72 Std. bei 37 °C und 7,5 % CO₂ inkubiert, sodass sich die 7TD1-Zellen abhängig vom IL-6-Gehalt der Probe bzw. des Standards vermehrten. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurden je 10 µl MTT-(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)-Lösung pro Loch zugegeben und die Platten daraufhin für weitere 4 Std. inkubiert. Anschließend wurde die dabei ablaufende Färbereaktion der 7TD1-Zellen durch Zugabe von 100 µl Stopplösung (zu gleichen Teilen Dodecylsulfat-Natrium-Salz (100 g/l Milli-Q) und Dimethylformamid) pro Loch gestoppt. Die entstandenen Farbkristalle wurden über Nacht auf einem Schüttler gelöst und die Extinktion am Folgetag bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen. Die Bestimmung der IL-6-Aktivität der untersuchten Proben fand mithilfe einer ED₅₀-Analyse statt. Die mittlere effektive Dosis (ED₅₀) bezeichnet die Konzentration einer Substanz, bei der eine halbmaximale Aktivierung beobachtet werden kann. In den durchgeführten Versuchen diente der Vergleich der Extinktionsmessungen der Proben mit denen eines rekombinanten IL-6-Standards bekannter Konzentration (10 ng/ml IL-6) als Grundlage zur Berechnung der IL-6-Konzentration.

3.4.2 Messung der IL-6-Konzentration mittels ELISA

Zum spezifischen Nachweis von humanem IL-6-Protein wurde ein ELISA-Kit (BD, OptEIA-Set Human IL-6, Sandwich-ELISA) verwendet. Zunächst wurde dabei der monoklonale *Capture*-Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 mit *Coating-Buffer* (0,1 M

Carbonatpuffer ($\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$), pH 9,5) auf 96-Loch-Platten aufgetragen und 24 Std. bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag wurde die Lösung aus den Löchern abgesaugt und die Platten anschließend dreimal mit Waschpuffer (PBS + 0,05 % Tween 20) gewaschen. Anschließend wurde Blockierungslösung (PBS + 10 % FKS) zu jedem Loch zugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Nach der Inkubationszeit wurden die Platten erneut abgesaugt und dreimal gewaschen. Danach erfolgte der Auftrag des IL-6-Standards sowie der Proben, woraufhin die Platten 2 Std. bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Die Platten wurden anschließend abgesaugt und fünfmal mit Waschpuffer gewaschen. Es folgte das Auftragen des *Working*-Detektors, zusammengesetzt aus dem monoklonalen biotinylierten Detektions-Antikörper und dem Peroxidase-Enzymreagenz. Beide Komponenten wurden im Verhältnis 1:1000 mit Blockierungslösung verdünnt. Der *Working*-Detektor wurde eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, die Platten wurden anschließend abgesaugt und siebenmal mit Waschpuffer gespült. Hiernach wurde Substratlösung, bestehend aus TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) und H_2O_2 , in jedes Loch gegeben, wodurch eine Farbentwicklung einsetzte. Diese wurde nach 10 bis 30 Min. Inkubationszeit bei Raumtemperatur durch Zugabe von Stopp-Lösung (2N H_2SO_4) abgebrochen. Innerhalb der nächsten 30 Min. konnte nun bei einer Wellenlänge von 450 nm photometrisch die Absorption der einzelnen Löcher gemessen werden und anhand der Eichkurve für die IL-6-Standard-Verdünnungsreihe die IL-6-Konzentration der Proben bestimmt werden.

3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der Statistiksoftware „IBM SPSS Statistics Version 25“. Die Messungen einzelner Versuchsbedingungen im 7TD1-Bioassay und ELISA erfolgten als Triplikate bzw. Quadruplikate. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt. Signifikanzen zum Vergleich zweier Bedingungen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test bestimmt (Signifikanzniveau: 5 %). Korrelationskoeffizienten wurden nach Pearson berechnet.

4 Ergebnisse

Frühere Experimente haben gezeigt, dass die Interaktion von humanen Monozyten und Gefäßmuskelzellen (GMZ) zu einer synergistisch erhöhten Zytokinproduktion in einem Kokulturmodell führt [Chen et al., 2009; Fu et al., 2014]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob auch murine Herz- und Gefäßzellen mit mononukleären Zellen (MNZ) in ähnlicher Weise interagieren können. Dies würde ermöglichen, mechanistische Untersuchungen des Synergismus mit genetisch veränderten Tieren durchzuführen bzw. sogar die Relevanz des Synergismus *in vivo* zu beleuchten. Als Marker für entzündliche Vorgänge wurde in dieser Arbeit biologisch aktives Interleukin-6 (IL-6) genutzt.

4.1 ELISA und 7TD1-Test liefern als Messmethode zur IL-6-Bestimmung vergleichbare Ergebnisse

Zunächst sollte untersucht werden, ob der in dieser Arbeit zur IL-6-Bestimmung eingesetzte 7TD1-Bioassay vergleichbare Messdaten liefert wie der in den erwähnten Vorarbeiten eingesetzte IL-6-ELISA. Hierfür wurde eine Monokultur humaner GMZ über Nacht mit verschiedenen Stimulantien inkubiert. Der IL-6-Gehalt der abgenommenen Überstände wurde anschließend im ELISA und im 7TD1-Bioassay gemessen und die Werte verglichen (Abbildung 2). Zunächst werden hier die mittels ELISA ermittelten IL-6-Konzentrationen beschrieben. Bereits unstimulierte GMZ sezernierten eine messbare IL-6-Konzentration (4,6 ng/ml). Eine Basissekretion in dieser Größenordnung entspricht den Ergebnissen der erwähnten früheren Versuche. Unter Einfluss von Lipopolysaccharid (LPS) in unterschiedlichen Konzentrationen zeigte sich eine geringe Zunahme der IL-6-Konzentration in den Kulturüberständen bis zu einem Maximum von 14 ng/ml IL-6 bei einer LPS-Konzentration von 100 ng/ml. Unter Stimulation durch Interleukin-1 (IL-1) war eine weitaus größere Zunahme der IL-6-Konzentration zu beobachten. So wurden 80 ng/ml IL-6 bei einer IL-1-Konzentration von 0,5 ng/ml erreicht. Auch durch Zugabe von Tumornekrosefaktor- α (TNF) wurde eine gesteigerte IL-6-Sekretion bewirkt (24 ng/ml). Eine kombinierte Stimulation durch IL-1 und TNF resultierte in einer noch höheren IL-6-Produktion von 115 ng/ml, der höchsten gemessenen IL-6-Konzentration in diesem Versuch. Unter Stimulation mit 25-Hydroxycholesterol (Chol) zeigte sich eine nur leicht erhöhte IL-6-Produktion (7,4 ng/ml bei 10 μ g/ml Chol).

Die mittels 7TD1-Bioassay ermittelten IL-6-Aktivitäten zeigten für alle Ansätze vergleichbare Tendenzen, jedoch lagen die Messwerte in einer anderen Größenordnung als die durch ELISA bestimmten. So ließ sich beispielsweise die Basissekretion unstimulierter GMZ im 7TD1-Bioassay auf eine IL-6-Aktivität von etwa 10 ng/ml beziffern, wohingegen im ELISA 4,6 ng/ml IL-6 gemessen worden waren. Die maximal gemessene

IL-6-Aktivität unter Stimulation durch IL-1 und TNF in Kombination betrug im 7TD1-Assay mit 267 ng/ml ebenfalls etwa das Zweifache der ELISA-Messung. Daraus kann man schließen, dass der 7TD1-Bioassay ähnlich verlässliche Messwerte für den IL-6-Gehalt der Proben liefert wie der ELISA. Vergleiche der absoluten Messwerte beider Verfahren sind jedoch nicht möglich. Alle weiteren IL-6-Aktivitätsbestimmungen wurden ausschließlich mithilfe des 7TD1-Bioassays durchgeführt.

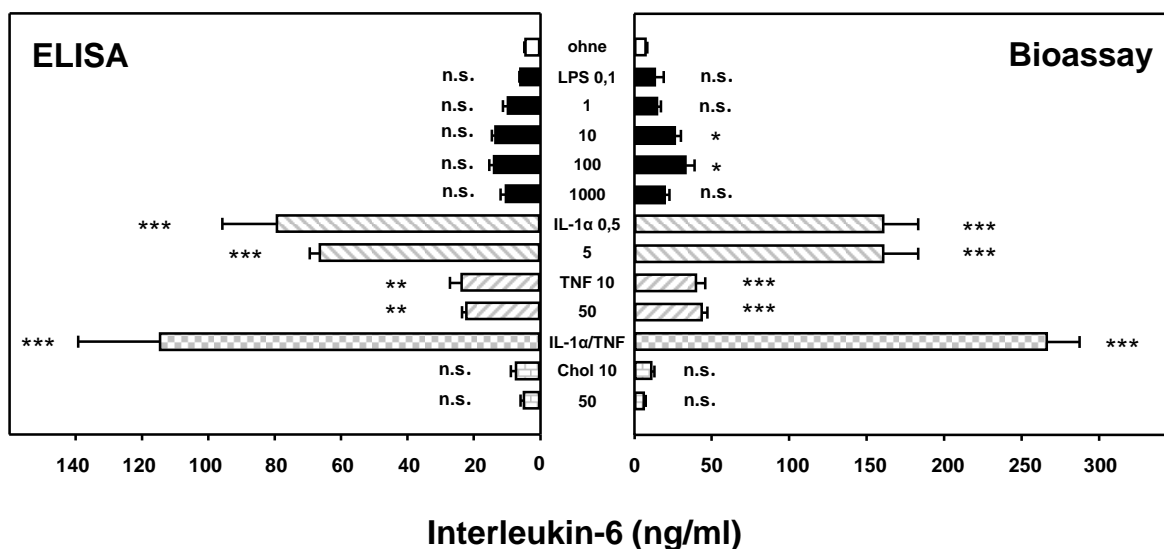


Abbildung 2: Die Messungen der IL-6-Konzentration in Kulturüberständen humaner Gefäßmuskelzellen (GMZ) korrelieren in ELISA und Bioassay (7TD1-Test). Humane GMZ wurden 24 Std. in 24-Loch-Platten (10.000 pro cm²) in Kulturmedium 3 inkubiert. Anschließend wurde das Medium unter Zugabe verschiedener Stimulantien (LPS, 0,1 bis 1000 ng/ml; IL-1α, 0,5 oder 5 ng/ml; TNF, 10 oder 50 ng/ml; IL-1α/TNF, 0,5 ng/ml und 10 ng/ml; 25-Hydroxycholesterol, 10 oder 50 µg/ml) bzw. Medium (ohne) erneuert. Nach erneuter 24-stündiger Inkubation wurden die Überstände der Kulturen abgenommen und deren IL-6-Konzentrationen im ELISA und 7TD1-Bioassay gemessen. Alle Messwerte wurden dabei als Triplikate angelegt. Dieses Experiment wurde einmal durchgeführt. Die ermittelten IL-6-Konzentrationen wurden als Mittelwert ± Standardfehler dargestellt. Die Signifikanzen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test berechnet (ohne vs. mit Stimulus; n.s., nicht signifikant; *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001).

4.2 In Kokulturen humaner Gefäßmuskelzellen und mononukleärer Zellen ist eine synergistische IL-6-Sekretion nachweisbar

Zur Bestätigung der früheren Daten erfolgten zunächst Kokulturexperimente mit humanen GMZ und humanen mononukleären Zellen (MNZ), entsprechend dem Experimentaufbau der früheren Versuche. Hierzu wurden humane GMZ (10.000 pro cm²) und humane MNZ (50.000 pro cm²) sowohl als Monokulturen, als auch als Kokultur eingesetzt, wobei das

Verhältnis von GMZ:MNZ in der Kokultur 1:5 entsprach. Zur Stimulation wurde LPS in die Hälfte der Ansätze eingebracht, sodass jede Mono- bzw. Kokulturbedingung sowohl mit als auch ohne LPS-Stimulation vorlag. Bereits unter unstimulierten Bedingungen produzierten die GMZ-Monokulturen IL-6 (8,7 ng/ml; Abbildung 3), vergleichbar mit dem Ergebnis in 4.1. Die IL-6-Basissekretion unstimulierter MNZ-Monokulturen fiel im Vergleich dazu deutlich geringer aus (0,2 ng/ml). Unter LPS-Stimulation zeigte sich ein signifikanter Anstieg der IL-6-Sekretion in GMZ-Monokulturen (46,2 ng/ml), nicht aber in MNZ-Monokulturen (15,7 ng/ml). LPS-stimulierte Kokulturen von GMZ und MNZ produzierten deutlich mehr IL-6 als unstimulierte Kokulturen (unstimuliert, 17,0 ng/ml; LPS-stimuliert, 229,0 ng/ml). Des Weiteren zeigten die Kokulturen sowohl unter unstimulierten als auch stimulierten Bedingungen eine synergistische (über-additive) IL-6-Sekretion, welche in Übereinstimmung mit den früheren Versuchen steht. Im abgebildeten Versuch entsprach der synergistische Effekt in der unstimulierten Kokultur dem 1,9-fachen der addierten GMZ- und MNZ-Monokulturen. Unter stimulierten Bedingungen zeigte sich in der Kokultur ein Synergismus von 3,7. Im homologen humanen Kokulturmodell von GMZ und MNZ konnte damit die Interaktion von GMZ und MNZ anhand der synergistischen IL-6-Sekretion bestätigt werden.

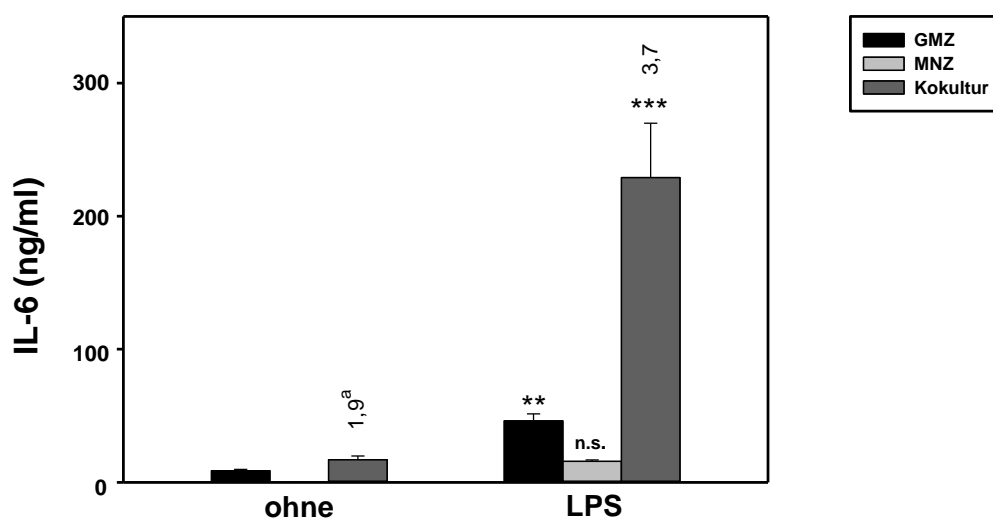


Abbildung 3: Kokulturen aus humanen Gefäßmuskelzellen (GMZ) und mononukleären Zellen (MNZ) zeigen eine synergistische IL-6-Sekretion. Humane GMZ wurden 24 Std. in 24-Loch-Platten (10.000 pro cm²) in Kulturmedium 3 inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und aus *Buffy Coat* isolierte humane MNZ (50.000 pro cm²) bzw. Kulturmedium 2 in die Ansätze eingebracht. Zu diesen Kulturen wurde LPS (100 ng/ml) bzw. Medium (ohne) zugegeben. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Überstände der Ansätze abgenommen und der IL-6-Gehalt mittels 7TD1-Bioassay gemessen. Alle Messwerte wurden dabei als Quadruplikate angelegt. Dieses Experiment wurde dreimal durchgeführt. Die ermittelten IL-6-Konzentrationen wurden als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt. Die Signifikanzen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test berechnet (ohne vs. mit LPS; n.s., nicht signifikant; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$). a, Synergismus der Kokultursätze, wurde als Quotient $IL-6_{Kokultur} / (IL-6_{GMZ} + IL-6_{MNZ})$ berechnet (synergistischer Effekt, wenn Quotient $> 1,2$).

4.3 Analyse der IL-6-Produktion muriner kardiovaskulärer Zellen in Kokulturen mit humanen mononukleären Zellen

In den folgenden Versuchen wurden murine GMZ, neonatale Rattenkardiomyozyten (nRKM) und Fibroblasten (Fib) des murinen Herzgewebes mit humanen MNZ in heterologen Kokulturen eingesetzt. Anhand dieser Experimente sollte eingeschätzt werden, ob murine kardiovaskuläre Zellen eine den humanen Gefäßmuskelzellen vergleichbare entzündliche Funktion in einem Kokulturmodell zeigen.

4.3.1 In Kokulturen von Gefäßmuskelzellen der Maus und humanen mononukleären Zellen ist eine synergistische IL-6-Sekretion nachweisbar

Ein erster heterologer Kokulturversuch erfolgte mit GMZ der Maus-Aortenwand, welche mit humanen MNZ kokultiviert wurden. Der Versuch wurde entsprechend dem Aufbau in 4.2 durchgeführt. Die Maus-GMZ zeigten in den durchgeführten Versuchen im Vergleich zu den oben beschriebenen humanen GMZ eine geringere IL-6-Basissekretion (0,4 ng/ml; Abbildung 4). Die LPS-Stimulation steigerte die IL-6-Sekretion der Maus-GMZ (11,4 ng/ml). Auch die IL-6-Produktion der humanen MNZ wurde durch LPS-Stimulation deutlich erhöht. Weiterhin zeigte sich eine synergistische IL-6-Produktion in den stimulierten Kokulturansätzen, die sich im abgebildeten Versuch auf das 1,7-fache der Summe der Monokulturen beziffern lässt. In unstimulierten Kokulturansätzen zeigte sich hingegen kein synergistischer Effekt.

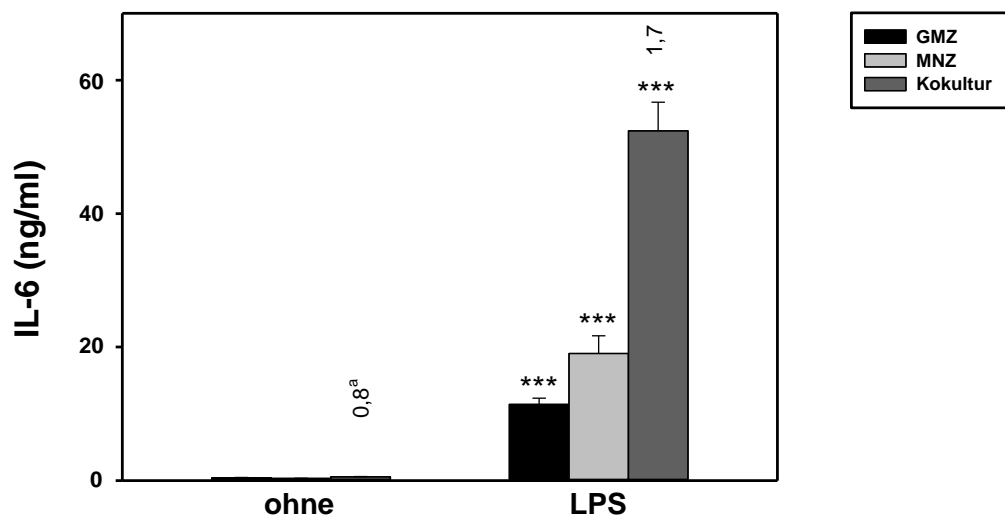


Abbildung 4: Stimulierte Kokulturen aus Gefäßmuskelzellen (GMZ) der Maus-Aortenwand und humanen mononukleären Zellen (MNZ) zeigen eine synergistische IL-6-Sekretion. GMZ der Maus-Aortenwand (10.000 pro cm²) wurden wie in Abb. 3 beschrieben kultiviert. In die Ansätze wurden humane MNZ (50.000 pro cm²) bzw. Kulturmedium 2 eingebracht. Stimulierung, Abnahme der Überstände sowie Messung der IL-6-Konzentration erfolgte wie in Abb. 3 beschrieben. Alle Messwerte wurden dabei als Triplikate angelegt. Dieses Experiment wurde viermal durchgeführt. Die Berechnung, Auswertung und statistische Bewertung der Daten erfolgte wie in Abb. 3 beschrieben. a, Synergismus der Kokulturansätze, wurde als Quotient $IL-6_{Kokultur} / (IL-6_{GMZ} + IL-6_{MNZ})$ berechnet (synergistischer Effekt, wenn Quotient > 1,2).

4.3.2 In Kokulturen von Gefäßmuskelzellen der Ratte und humanen mononukleären Zellen ist eine synergistische IL-6-Sekretion nachweisbar

Neben den GMZ der Mauseortenwand (siehe 4.3.1) wurden im folgenden Experiment auch GMZ der Ratten-Aortenwand mit humanen MNZ kokultiviert. Die humanen MNZ wurden hierbei in Konzentrationen von 10.000 bis 400.000 MNZ pro cm² eingesetzt, was einem Verhältnis GMZ:MNZ von 1:1 bis 1:40 entspricht. Die verschiedenen Mono- und Kokulturen wurden jeweils mit und ohne Stimulation durch LPS inkubiert (Abbildung 5). Monokulturen der Ratten-GMZ zeigten bereits unter unstimulierten Bedingungen eine IL6-Basissekretion (0,7 ng/ml), durch Zugabe von LPS steigerte sich die IL-6-Sekretion auf ungefähr das Doppelte. Die Monokulturen humaner MNZ zeigten bis hin zur maximalen Konzentration von 400.000 MNZ pro cm² unter unstimulierten Bedingungen eine nur sehr geringe IL-6-Basissekretion. Unter LPS-Stimulation war mit steigender MNZ-Zahl eine deutliche Zunahme der IL-6-Sekretion durch die MNZ zu verzeichnen. Eine synergistische IL-6-Sekretion ließ sich in allen getesteten Kokulturen nachweisen. Unter unstimulierten Bedingungen nahm mit steigendem Verhältnis GMZ:MNZ bis 1:20 (200.000 MNZ pro cm²) sowohl die IL-6-Aktivität (bis 30,7 ng/ml), als auch der Synergismus (max. 41,5-fach) stetig zu. Die Stimulation durch LPS steigerte die IL-6-Aktivität der Kokulturen zusätzlich (max. 65,3 ng/ml). Der synergistische Effekt stimulierter Kokulturansätze ergab rechnerisch aufgrund der hohen IL-6-Sekretion der stimulierten MNZ jedoch nur vergleichsweise niedrige Werte (max. 4,5-facher Synergismus).

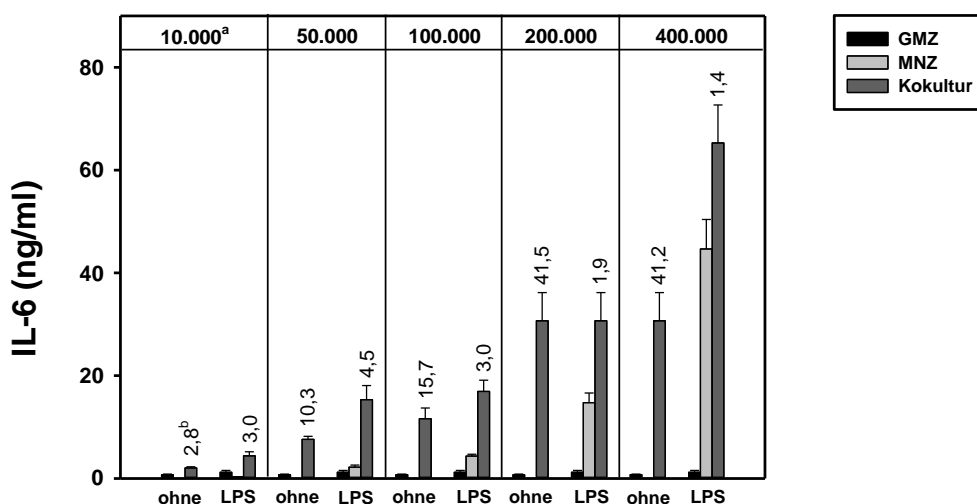


Abbildung 5: Kokulturen aus Gefäßmuskelnzellen (GMZ) der Ratte und humanen mononukleären Zellen (MNZ) zeigen eine synergistische IL-6-Sekretion, diese ist abhängig von der MNZ-Konzentration. GMZ der Ratten-Aortenwand (10.000 pro cm²) wurden wie in Abb. 3 beschrieben kultiviert. In die Ansätze wurden humane MNZ in verschiedenen Konzentrationen (10.000 bis 400.000 pro cm²; entspricht GMZ:MNZ 1:1 bis 1:40) bzw. Kulturmedium 2 eingebracht. Stimulierung, Abnahme der Überstände sowie Messung der IL-6-Konzentration erfolgte ebenfalls wie in Abb. 3 beschrieben. Alle Messwerte wurden dabei als Triplikate angelegt. Dieses Experiment wurde einmal durchgeführt. Die Berechnung und Auswertung der Daten erfolgte wie in Abb. 3 beschrieben. a, MNZ-Konzentration (Zellen pro cm²). b, Synergismus der Kokulturansätze, wurde als Quotient $IL-6_{Kokultur} / (IL-6_{GMZ} + IL-6_{MNZ})$ berechnet (synergistischer Effekt, wenn Quotient > 1,2).

4.3.3 In Kokulturen von Kardiomyozyten der Ratte und humanen mononukleären Zellen ist eine synergistische IL-6-Sekretion nachweisbar

Als nächstes wurden aus neonatalen Wistar-Ratten isolierte Kardiomyozyten (nRKM) mit humanen MNZ kokultiviert. Eingesät wurden die nRKM in einer Zellkonzentration von 120.000 Zellen pro cm², diese Konzentration wurde aufgrund früherer Versuche der Arbeitsgruppe mit nRKM gewählt. Getestet wurden Kokulturen von nRKM mit unterschiedlichen Konzentrationen humaner MNZ. Unstimulierte nRKM-Monokulturen zeigten eine nur niedrige IL-6-Basissekretion (0,4 ng/ml; Abbildung 6). In Anwesenheit von LPS (100 ng/ml) steigerte sich die IL-6-Produktion um ein Vielfaches (10,6 ng/ml). In den MNZ-Monokulturen stieg die IL-6-Aktivität mit steigender MNZ-Konzentration sowohl in den unstimulierten als auch in den stimulierten Kulturen. Auch in den Kokulturansätzen zeigte sich bei steigender MNZ-Konzentration ein Anstieg der IL-6-Aktivität. Eine deutliche synergistische IL-6-Produktion war hierbei in allen stimulierten Kokulturen zu verzeichnen.

Im abgebildeten Versuch schwankte die synergistische IL-6-Produktion in stimulierten Kokulturen zwischen dem 5,7- und dem 12,5-fachen und erreichte ihr rechnerisches Maximum in Kokulturen mit einer MNZ-Konzentration von 100.000 Zellen pro cm².

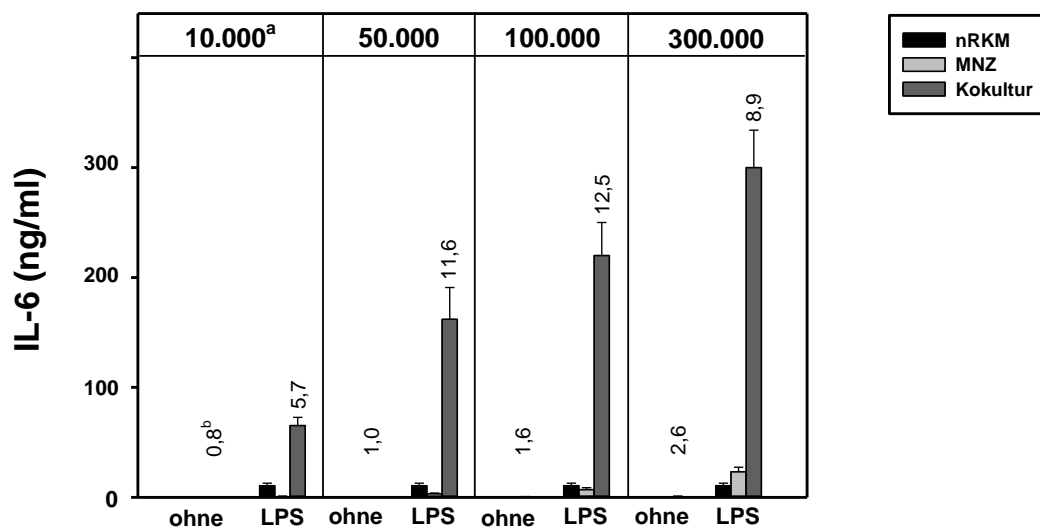


Abbildung 6: Stimulierte Kokulturen von neonatalen Rattenkardiomyozyten (nRKM) und humanen mononukleären Zellen (MNZ) zeigen eine MNZ-konzentrationsabhängige synergistische IL-6-Sekretion. nRKM (120.000 pro cm²) wurden zunächst 24 Std. in 24-Loch-Platten in CMRL-Wachstumsmedium inkubiert. Anschließend wurden die nRKM nach zweifachem Waschen in serumfreiem Kulturmedium 1 weiterkultiviert. Nach weiteren 24 Std. wurde dieses Medium entfernt. Aus *Buffy Coat* isolierte humane MNZ (10.000 bis 300.000 pro cm²) bzw. Kulturmedium 2 wurde in die Ansätze eingebracht. Stimulierung, Abnahme der Überstände sowie Messung der IL-6-Konzentration erfolgte wie in Abb. 3 beschrieben. Alle Messwerte wurden dabei als Quadruplikate angelegt. Dieses Experiment wurde dreimal durchgeführt. Die Berechnung und Auswertung der Daten erfolgte wie in Abb. 3 beschrieben. a, MNZ-Konzentration (Zellen pro cm²). b, Synergismus der Kokulturansätze, wurde als Quotient $IL-6_{Kokultur} / (IL-6_{nRKM} + IL-6_{MNZ})$ berechnet (synergistischer Effekt, wenn Quotient > 1,2).

Im nächsten Experiment wurden steigende LPS-Konzentrationen bei konstanter nRKM- und MNZ-Konzentration eingesetzt (Abbildung 7). In den nRKM-Monokulturen zeigte sich ein stetiger LPS-konzentrationsabhängiger Anstieg der IL-6-Produktion (max. 10,4 ng/ml). Die humanen MNZ erreichten bei einer LPS-Konzentration von 1 ng/ml ihre maximale IL-6-Produktion (2,7 ng/ml). In den Kokulturansätzen stellte sich ab einer LPS-Konzentration von 0,1 ng/ml ein Plateau ein, die maximale IL-6-Produktion (136,8 ng/ml) wurde bei 100 ng/ml LPS erreicht. Ein synergistischer Effekt war ab einer LPS-Konzentration von 0,01 ng/ml in allen Kokulturansätzen zu verzeichnen. Der Synergismus schwankte hierbei zwischen 2,8 und 29,8, wobei das Maximum bereits bei 0,1 ng/ml LPS zu beobachten war.

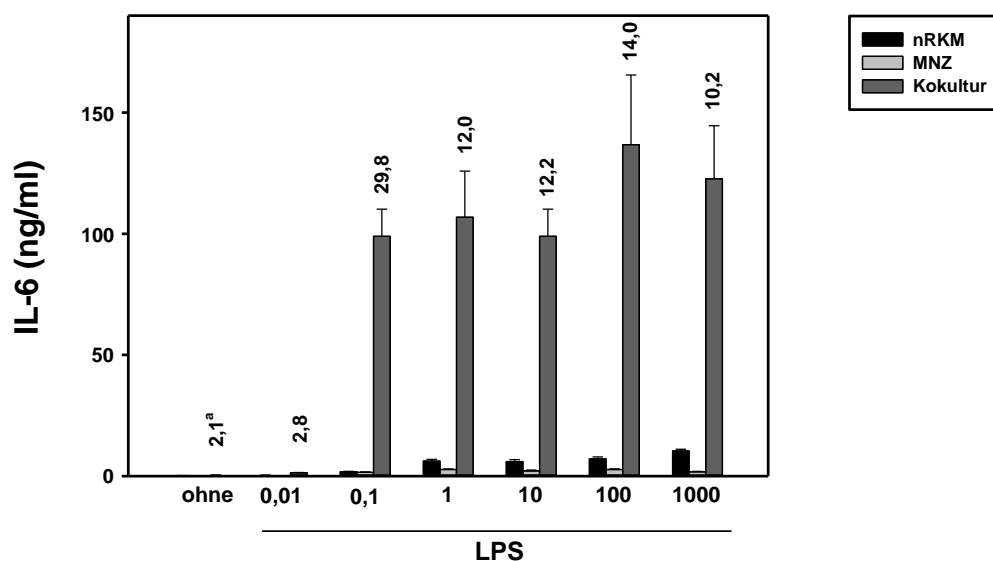


Abbildung 7: Unterschiedliche LPS-Konzentrationen stimulieren in Kokulturen von neonatalen Rattenkardiomyozyten (nRKM) und humanen mononukleären Zellen (MNZ) eine synergistische IL-6-Sekretion. nRKM (120.000 pro cm²) wurden wie in Abb. 6 beschrieben kultiviert. In die Ansätze wurden humane MNZ (50.000 pro cm²) bzw. Kulturmedium 2 eingebracht. Die Zellen wurden ohne bzw. mit LPS (0,01, 0,1, 1, 10, 100, 1000 ng/ml) inkubiert. Die Abnahme der Überstände sowie die Messung der IL-6-Konzentration erfolgte wie in Abb. 3 beschrieben. Alle Messwerte wurden dabei als Quadruplikate angelegt. Dieses Experiment wurde dreimal durchgeführt. Die Berechnung und Auswertung der Daten erfolgte wie in Abb. 3 beschrieben. a, Synergismus der Kokulturansätze, wurde als Quotient $IL-6_{Kokultur} / (IL-6_{nRKM} + IL-6_{MNZ})$ berechnet (synergistischer Effekt, wenn Quotient > 1,2).

4.3.4 In Kokulturen von kardialen Fibroblasten der Ratte und humanen mononukleären Zellen ist eine synergistische IL-6-Sekretion nachweisbar

Aus den Herzen neonataler Wistar-Ratten isolierte Fibroblasten (Fib) wurden ebenfalls in Kokulturen verwendet. Hierzu wurden Fib in zwei Konzentrationen eingesät und mit humanen MNZ in verschiedenen Konzentrationen in Kokultur gebracht (Abbildung 8). In beiden Einsaatkonzentrationen zeigten unstimulierte Ratten-Fib eine sehr geringe IL-6-Basissekretion (0,01 bzw. 0,1 ng/ml), die unter Zugabe von LPS (100 ng/ml) leicht anstieg (0,5 bzw. 5,1 ng/ml). Mit steigender MNZ-Konzentration war in den MNZ-Monokulturen, wie auch in 4.3.3 beschrieben, eine zellzahlabhängige Zunahme der IL-6-Produktion zu beobachten. Auch in den Kokulturen stieg mit zunehmender MNZ-Konzentration die IL-6-Produktion an. Bei allen eingesetzten Kokulturverhältnissen war unter LPS-Stimulation ein synergistischer Effekt nachzuweisen. Der Synergismus betrug 2,4, 2,0 und 1,6 (10.000 Fib pro cm²) bzw. 5,6, 5,7 und 6,2 (30.000 Fib pro cm²). Der IL-6-Gehalt in den

Fib-Monokulturen und in den Kokulturen war dabei in den Ansätzen mit 30.000 Fib pro cm² grundsätzlich höher (bis max. 300 ng/ml) als in denen mit 10.000 Fib pro cm² (bis max. 83,3 ng/ml), jedoch zeigten sich für beide Zellkonzentrationen die gleichen Tendenzen.

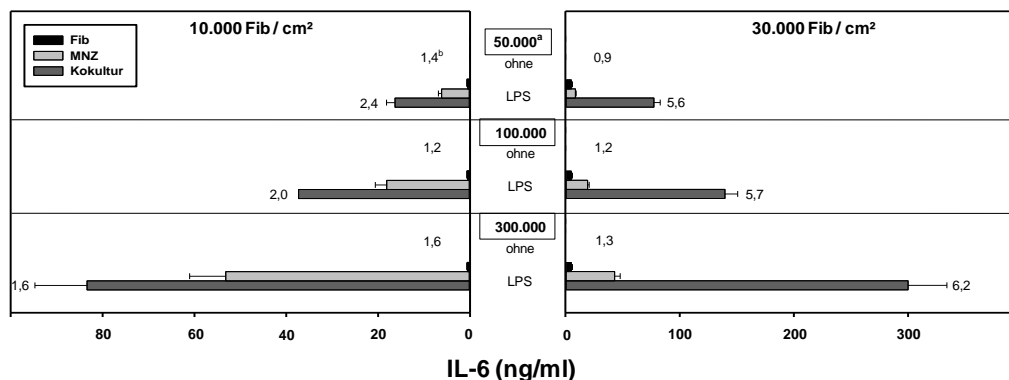


Abbildung 8: Stimulierte Kokulturen von Fibroblasten (Fib) der Ratte und humanen mononukleären Zellen (MNZ) zeigen eine synergistische, zellzahlabhängige IL-6-Sekretion. Aus neonatalen Ratten isolierte kardiale Fib wurden 24 Std. in 24-Loch-Platten (10.000 bzw. 30.000 pro cm²) mit Kulturmedium 2 inkubiert. Am Folgetag wurde das Medium aus den Kulturen entfernt und aus *Buffy Coat* isolierte humane MNZ (50.000, 100.000 bzw. 300.000 pro cm²) bzw. Kulturmedium 2 wurden in die Ansätze eingebracht. Stimulierung, Abnahme der Überstände sowie Messung der IL-6-Konzentration erfolgte wie in Abb. 3 beschrieben. Alle Messwerte wurden dabei als Quadruplikate angelegt. Das Experiment wurde einmal durchgeführt. Die Berechnung und Auswertung der Daten erfolgte wie in Abb. 3 beschrieben. a, MNZ-Konzentration (Zellen pro cm²). b, Synergismus der Kokulturansätze, wurde als Quotient $IL-6_{Kokultur} / (IL-6_{Fib} + IL-6_{MNZ})$ berechnet (synergistischer Effekt, wenn Quotient > 1,2).

Weiterhin wurde die Aktivierung von Fib- und MNZ-Monokulturen bzw. Kokulturen in Abhängigkeit von verschiedenen LPS-Konzentrationen untersucht (Abbildung 9). Auch hier entsprach die Tendenz des IL-6-Gehalts in Ansätzen mit 10.000 der in Ansätzen mit 30.000 Fib pro cm². Mit steigender LPS-Konzentration steigerte sich die IL-6-Produktion der Fib. Demgegenüber blieb die IL-6-Produktion der MNZ weitgehend konstant. Die maximale IL-6-Aktivität in den Kokulturansätzen wurde im Falle der Einsaat von 10.000 Fib/cm² bei Stimulierung mit 100 ng/ml LPS (16,3 ng/ml IL-6) bzw. bei Einsaat von 30.000 Fib/cm² bei Stimulierung mit 10 ng/ml LPS (113,7 ng/ml IL-6) gemessen. In den stimulierten Kokulturansätzen zeigten sich synergistische Effekte des 1,7- bis 2,1-fachen bei 10.000 Fib pro cm² bzw. des 5,7- bis 9,8-fachen bei 30.000 Fib pro cm².

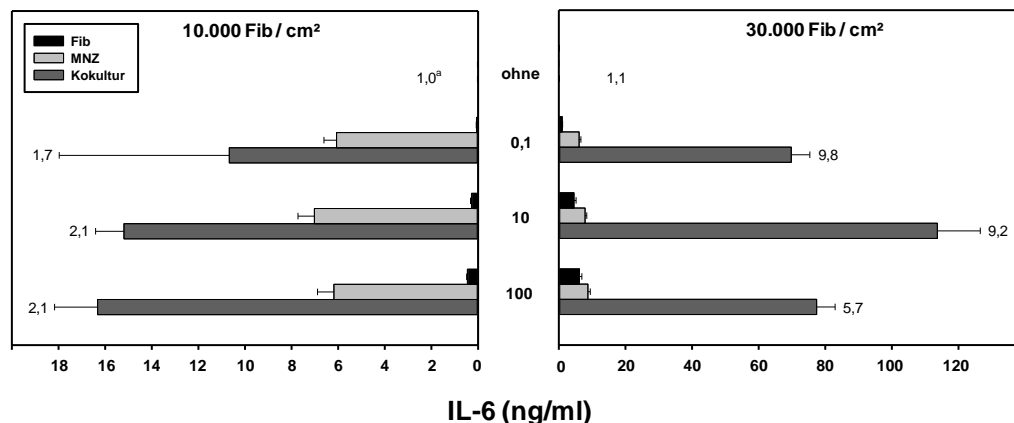


Abbildung 9: Unterschiedliche LPS-Konzentrationen stimulieren in Kokulturen von Fibroblasten (Fib) der Ratte mit humanen mononukleären Zellen (MNZ) eine synergistische IL-6-Sekretion. Fib (10.000 bzw. 30.000 pro cm²) wurden wie in Abb. 8 beschrieben kultiviert. In die Ansätze wurden humane MNZ (50.000 pro cm²) bzw. Kulturmedium 2 eingebracht. Die Zellen wurden ohne bzw. mit LPS (0,1, 10, 100 ng/ml) inkubiert. Die Abnahme der Überstände der Mono- bzw. Kokulturen sowie die Messung deren IL-6-Gehalts erfolgte wie in Abb. 3 beschrieben. Alle Messwerte wurden dabei als Quadruplikate angelegt. Dieses Experiment wurde einmal durchgeführt. Die Berechnung und Auswertung der Daten erfolgte wie in Abb. 3 beschrieben. a, Synergismus der Kokulturansätze, wurde als Quotient $IL-6_{Kokultur} / (IL-6_{Fib} + IL-6_{MNZ})$ berechnet (synergistischer Effekt, wenn Quotient > 1,2).

Insgesamt konnte damit für alle getesteten murinen kardiovaskulären Zellen eine inflammatorische Interaktion mit humanen MNZ im heterologen Kokulturmodell anhand einer synergistischen IL-6-Sekretion nachgewiesen werden. Der Synergismus war dabei in den unterschiedlichen Kokulturmodellen unterschiedlich stark ausgeprägt.

4.4 Analyse der IL-6-Produktion muriner kardiovaskulärer Zellen in Kokulturen mit murinen mononukleären Zellen

Zusätzlich zu den oben beschriebenen heterologen Kokulturversuchen humaner MNZ mit murinen Zellen wurden homologe Kokulturversuche durchgeführt, in denen sowohl die eingesetzten MNZ, als auch die Gefäßmuskel- bzw. Herzzellen murinen Ursprungs waren. Hiermit sollte untersucht werden, ob ein homologes murines Kokulturmodell als Grundlage weitergehender Untersuchungen dienen kann.

4.4.1 In Kokulturen von Gefäßmuskelzellen und mononukleären Zellen der Ratte ist eine synergistische IL-6-Sekretion nachweisbar

Zunächst wurden Gefäßmuskelzellen (GMZ) der Aortenwand von Wistarratten mit

unterschiedlichen Konzentrationen MNZ der Wistar ratte in Kokultur gebracht (Abbildung 10). Wie bereits in 4.3.2 dargestellt, zeigten die murinen GMZ bereits unstimuliert eine IL-6-Basissekretion (0,7 ng/ml). LPS steigerte die IL-6-Produktion der GMZ-Monokulturen nur geringfügig. In den Monokulturen unstimulierter muriner MNZ zeigte sich eine sehr geringe IL-6-Produktion. Dagegen stieg in LPS-stimulierten MNZ-Monokulturen die IL-6-Produktion mit steigender MNZ-Konzentration an (max. 0,7 ng/ml IL-6). Ein vergleichbares Verhalten hatten auch humane MNZ gezeigt. Unstimulierte Kokulturen muriner GMZ mit murinen MNZ zeigten eine maximale IL-6-Sekretion von 7,2 ng/ml, stimulierte Kokulturen zeigten eine maximale IL-6-Sekretion von 22,0 ng/ml. Unter allen eingesetzten Versuchsbedingungen war in diesen Kokulturen eine synergistische IL-6-Sekretion sowohl ohne als auch mit Stimulation durch LPS zu verzeichnen, wie bereits in Kokulturen mit humanen MNZ (4.3.2) beobachtet. In den Kokulturansätzen ohne LPS-Stimulation wurde hierbei im abgebildeten Versuch ein Synergismus von 3,3 bis 10,4 erreicht. Unter LPS-Stimulation wurde ein Synergismus von 2,3 bis 12,4 nachgewiesen. Diese Daten zeigen, dass auch im homologen murinen System synergistische Interaktion vorhanden ist.

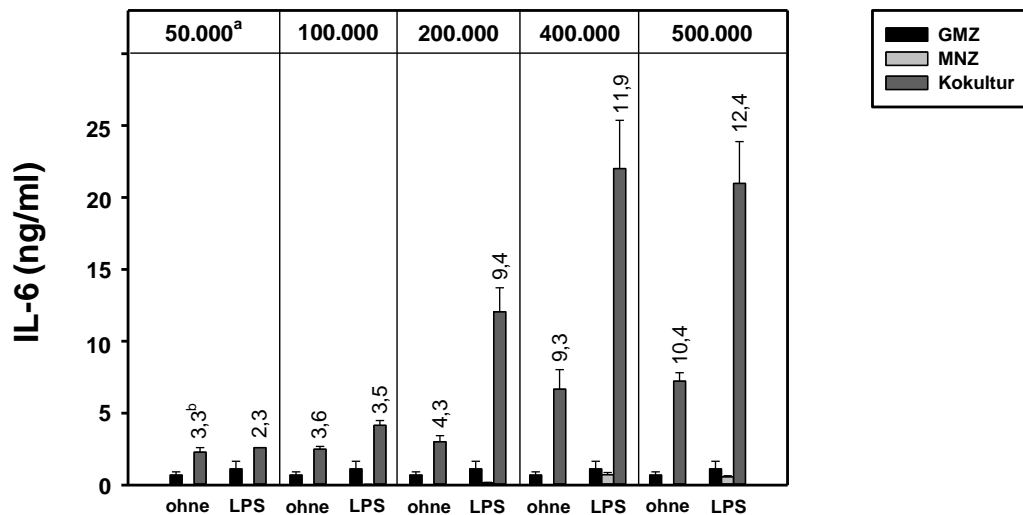


Abbildung 10: Kokulturen aus Gefäßmuskelzellen (GMZ) und mononukleären Zellen (MNZ) der Ratte zeigen eine synergistische IL-6-Sekretion. GMZ der Ratten-Aortenwand (10.000 pro cm²) wurden wie in Abb. 3 beschrieben kultiviert. In die Ansätze wurden MNZ der Ratte (50.000 bis 500.000 pro cm²) bzw. Kulturmedium 2 eingebracht. Stimulierung, Abnahme der Überstände sowie Messung der IL-6-Konzentration erfolgte wie in Abb. 3 beschrieben. Alle Messwerte wurden dabei als Triplikate angelegt. Dieses Experiment wurde zweimal durchgeführt. Die Berechnung und Auswertung der Daten erfolgte wie in Abb. 3 beschrieben. a, MNZ-Konzentration (Zellen pro cm²). b, Synergismus der Kokulturansätze, wurde als Quotient $IL-6_{Kokultur} / (IL-6_{GMZ} + IL-6_{MNZ})$ berechnet (synergistischer Effekt, wenn Quotient > 1,2).

4.4.2 In Kokulturen von Kardiomyozyten und mononukleären Zellen der Ratte ist eine synergistische IL-6-Sekretion nachweisbar

Als nächstes wurden neonatale Rattenkardiomyozyten (nRKM) mit Ratten-MNZ kokultiviert. Verschiedene Kokulturverhältnisse kamen dabei zur Anwendung (Abbildung 11). Die nRKM-Monokulturen zeigten, wie bereits in 4.3.3 beschrieben, unstimuliert eine IL-6-Basissekretion. LPS-Stimulation steigerte die IL-6-Produktion. In Monokulturen unstimulierter Ratten-MNZ nahm, wie im vorangegangenen Versuch (4.4.1), die IL-6-Produktion mit steigender MNZ-Konzentration zu. Die Stimulation mit LPS steigerte die IL-6-Produktion zusätzlich. In den Kokulturen zeigte sich im abgebildeten Versuch ab einer MNZ-Konzentration von 50.000 MNZ pro cm² eine synergistische IL-6-Sekretion. In unstimulierten Kokulturen war dabei ein Synergismus von 1,4 bis 19,7 nachweisbar. In den LPS-stimulierten Kokulturen war ein Synergismus von 1,9 bis 15,0 vorhanden. Die absolute IL-6-Sekretion nahm mit steigender MNZ-Konzentration ebenfalls zu, auf maximal 44,6 ng/ml (unstimuliert) bzw. 85,1 ng/ml IL-6 (LPS-stimuliert). Die Daten weisen darauf hin, dass auch in Kokulturen von Herzmuskelzellen mit Ratten-MNZ, wie bereits in homologen murinen GMZ-MNZ-Kokulturen, eine Zellinteraktion vorhanden ist, die sich auf die Sekretion von IL-6 auswirkt.

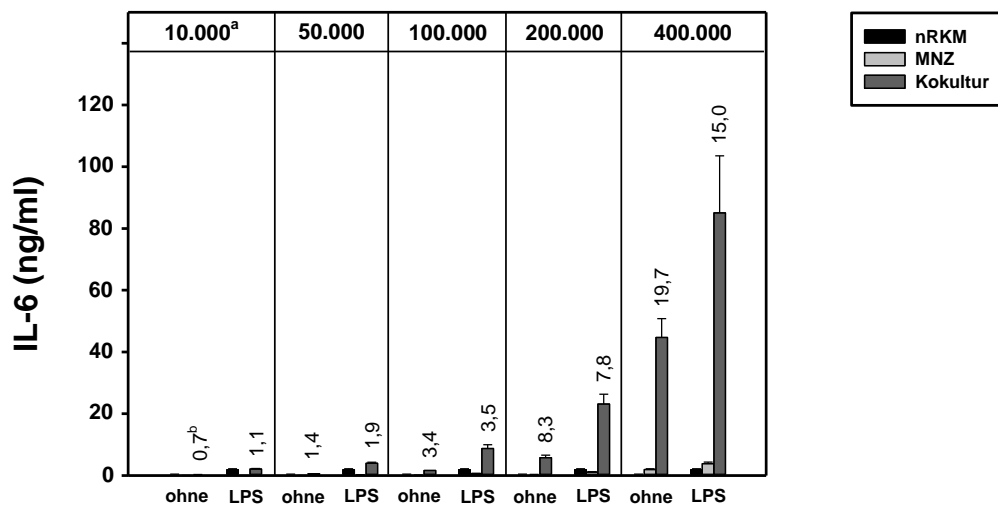


Abbildung 11: Kokulturen aus neonatalen Rattenkardiomyozyten (nRKM) und mononukleären Zellen (MNZ) der Ratte zeigen eine MNZ-konzentrationsabhängige synergistische IL-6-Sekretion. nRKM (120.000 pro cm²) wurden wie in Abb. 6 beschrieben kultiviert. In die Ansätze wurden Ratten-MNZ (10.000 bis 400.000 pro cm²) bzw. Kulturmedium 2 eingebracht. Stimulierung, Abnahme der Überstände sowie Messung der IL-6-Konzentration erfolgte wie in Abb. 3 beschrieben. Alle Messwerte wurden dabei als Triplikate angelegt. Vergleichbare Experimente wurden insgesamt fünfmal durchgeführt. Die Berechnung und Auswertung der Daten erfolgte wie in Abb. 3 beschrieben. a, MNZ-Konzentration (Zellen pro cm²). b, Synergismus der Kokulturansätze, wurde als Quotient $IL-6_{Kokultur} / (IL-6_{nRKM} + IL-6_{MNZ})$ berechnet (synergistischer Effekt, wenn Quotient > 1,2).

In der Zusammenschau der durchgeführten Kokulturversuche der nRKM mit murinen MNZ korrelierte der Synergismus der IL-6-Sekretion mit der eingesetzten MNZ-Konzentration (Abbildung 12). Zwar zeigten sich teilweise bei identischen MNZ-Konzentrationen variable Synergismen, beispielsweise in unstimulierten Kokulturen mit 200.000 MNZ pro cm² Synergismen zwischen 1,7 und 8,3 bzw. in LPS-stimulierten Kokulturen mit 200.000 MNZ pro cm² Synergismen zwischen 3,0 und 7,8, dennoch ergab sich sowohl für unstimulierte als auch LPS-stimulierte Kokulturen ein starker positiver Zusammenhang zwischen eingesetzter MNZ-Konzentration und Synergismus.

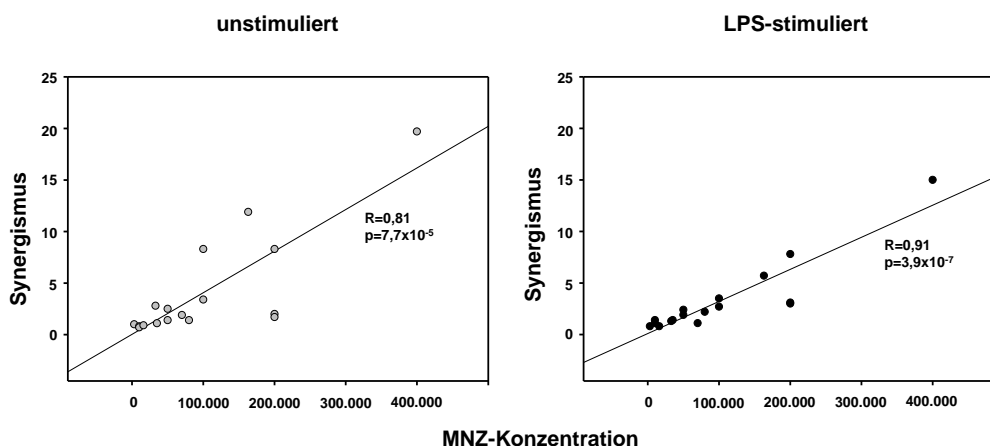


Abbildung 12: Der Synergismus in Kokulturen von neonatalen Rattenkardiomyozyten (nRKM) und mononukleären Zellen (MNZ) der Ratte korreliert mit der MNZ-Konzentration. Die abgebildeten Daten zeigen eine Zusammenfassung aller sechs Kokulturversuche von nRKM und Ratten-MNZ mit synergistischer IL-6-Sekretion. Aufbau und Durchführung der Versuche entsprachen dabei dem Experiment in Abb. 11. Allerdings wurden nicht in allen Versuchen identische MNZ-Konzentrationen eingesetzt. Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten R und dessen Signifikanz p erfolgte in der Analyse nach Pearson.

Neben dem zuvor beschriebenen LPS wurden auch andere Stimulantien in der Kokultur von nRKM und Ratten-MNZ untersucht (Abbildung 13). In Übereinstimmung mit den oben dargestellten Ergebnissen zeigte sich eine verstärkte IL-6-Sekretion in den LPS-stimulierten Mono- und Kokulturen (Synergismus 3,1). Stimulation mit 25-Hydroxycholesterol (Chol) führte in den nRKM- und MNZ-Monokulturen zu keiner erhöhten IL-6-Sekretion. Chol-stimulierte Kokulturen zeigten jedoch eine verstärkte IL-6-Sekretion (33,9 ng/ml) und der synergistische Effekt steigerte sich bis auf das 45-fache. Unter den getesteten Stimulantien bewirkte Chol damit den ausgeprägtesten Synergismus in der Kokultur. Stimulation mit IL-1 α führte zu einer ausgeprägten Steigerung der IL-6-Sekretion in den nRKM-Monokulturen (bis 55,0 ng/ml) ebenso wie in den Kokulturen (bis 102,2 ng/ml), woraus sich ein Synergismus von maximal 2,0 ergab. In den TNF-

stimulierten nRKM-Monokulturen und Kokulturen zeigte sich eine leicht erhöhte IL-6-Produktion (1,9 ng/ml bzw. 4,1 ng/ml) bei einem Synergismus von 2,2. Gleichzeitige Stimulation mit IL-1 α und TNF führte ebenfalls zu einer ausgeprägten Erhöhung der IL-6-Sekretion in der nRKM-Monokultur (bis 117,9 ng/ml) und in der Kokultur (bis 139,6 ng/ml) und damit zu den höchsten gemessenen IL-6-Konzentrationen dieses Versuchs. Rechnerisch ergab sich für die IL-6-Produktion in der Kokultur jedoch kein synergistischer Effekt (1,2). Harnsäure und Palmitinsäure zeigten keine stimulierende Wirkung auf die nRKM, MNZ bzw. die Kokulturen und verursachten damit auch keinen relevanten Synergismus.

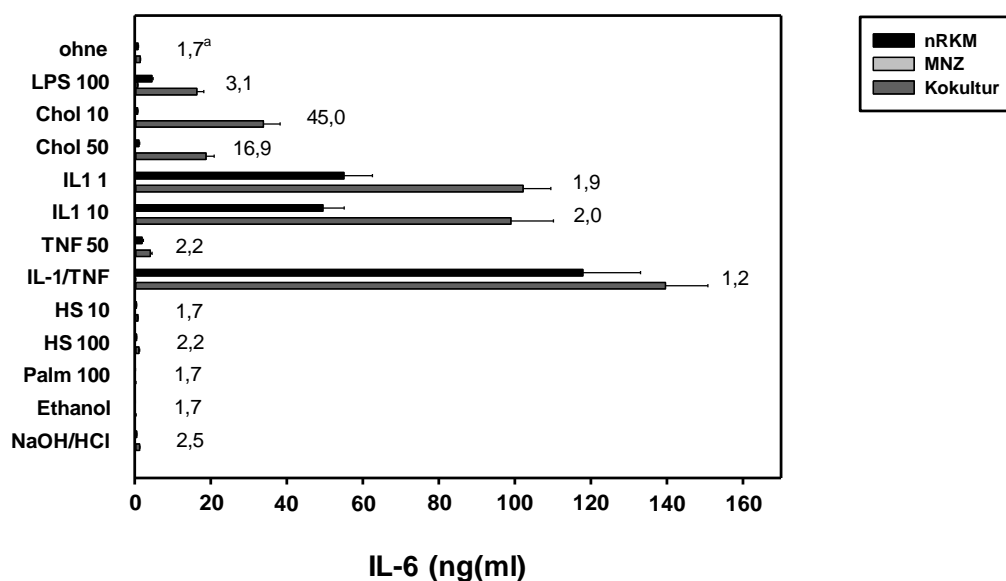


Abbildung 13: In Kokulturen neonataler Rattenkardiomyozyten (nRKM) mit murinen mononukleären Zellen (MNZ) stimulieren Lipopolysaccharid (LPS), 25-Hydroxycholesterol (Chol), Interleukin-1 α (IL-1 α) oder Tumornekrosefaktor- α (TNF) eine synergistische IL-6-Sekretion. nRKM (120.000 pro cm²) wurden wie in Abb. 6 beschrieben kultiviert. In die Ansätze wurden MNZ der Ratte (200.000 pro cm²) bzw. Kulturmedium 2 eingebracht. Die Kulturen wurden mit verschiedenen Stimuli inkubiert (LPS, 100 ng/ml; Chol, 10 oder 50 μ g/ml; IL-1 α , 1 oder 10 ng/ml; TNF, 50 ng/ml; IL-1 α /TNF, 1 ng/ml und 10 ng/ml; Harnsäure, 10 oder 100 μ g/ml; Palmitinsäure, 100 μ mol/l). Als Negativkontrollen wurden Ethanol, NaOH/HCl bzw. Medium (ohne) eingesetzt. Die Abnahme der Überstände sowie die Messung der IL-6-Konzentration erfolgten wie in Abb. 3 beschrieben. Alle Messwerte wurden dabei als Quadruplikate angelegt. Dieses Experiment wurde zweimal durchgeführt. Die Berechnung und Auswertung der Daten erfolgte wie in Abb. 3 beschrieben. a, Synergismus der Kokulturansätze, wurde als Quotient $IL-6_{Kokultur} / (IL-6_{nRKM} + IL-6_{MNZ})$ berechnet (synergistischer Effekt, wenn Quotient > 1,2).

4.4.3 In Kokulturen von kardialen Fibroblasten und mononukleären Zellen der Ratte ist eine synergistische IL-6-Sekretion nachweisbar

Abschließend wurden murine MNZ auch in Kokulturen mit Fibroblasten (Fib) der Wistar ratte untersucht (Abbildung 14). Unter den zwei getesteten Fib-Konzentrationen zeigten sich auch in diesem Versuch vergleichbare Tendenzen (vgl. 4.3.4). Unstimulierte Fib zeigten eine sehr niedrige IL-6-Basissekretion. LPS-Stimulation steigerte die IL-6-Produktion in Fib-Monokulturen. Auch die gemessene IL-6-Basissekretion der MNZ sowie die IL-6-Sekretion der LPS-stimulierten MNZ entsprachen den vorangegangenen Versuchen mit Ratten-MNZ. Stimulierte Kokulturen zeigten eine IL-6-Sekretion von 0,7 ng/ml (10.000 Fib/cm²) bzw. 4,6 ng/ml (30.000 Fib/cm²). Dies entspricht einem Synergismus von 2,7 bzw. 2,3. Die absoluten IL-6-Konzentrationen und der rechnerisch erhaltene Synergismus bleiben damit auf einem etwas niedrigeren Niveau als im heterologen Kokulturmodell von Fib und humanen MNZ.

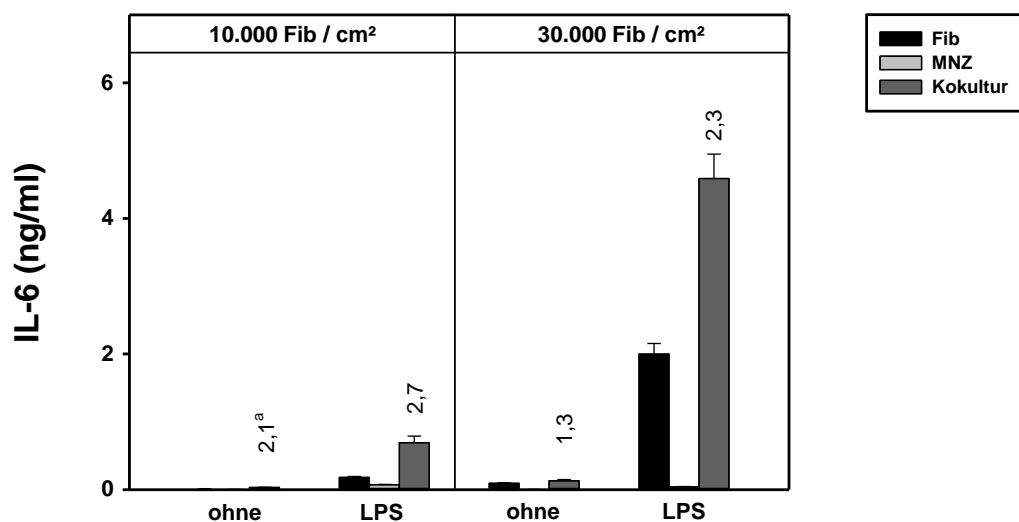


Abbildung 14: Stimulierte Kokulturen von Fibroblasten (Fib) der Ratte und mononukleären Zellen (MNZ) der Ratte zeigen eine synergistische IL-6-Sekretion. Fib (10.000 bzw. 30.000 pro cm²) wurden wie in Abb. 8 beschrieben kultiviert. In die Ansätze wurden MNZ der Ratte (50.000 pro cm²) bzw. Kulturmedium 2 eingebracht. Stimulierung, Abnahme der Überstände der Mono- bzw. Kokulturen sowie die Messung deren IL-6-Gehalts erfolgte wie in Abb. 3 beschrieben. Alle Messwerte wurden dabei als Triplikate angelegt. Dieses Experiment wurde zweimal durchgeführt. Die Berechnung und Auswertung der Daten erfolgte wie in Abb. 3 beschrieben. a, Synergismus der Kokulturansätze, wurde als Quotient $IL-6_{Kokultur} / (IL-6_{Fib} + IL-6_{MNZ})$ berechnet (synergistischer Effekt, wenn Quotient > 1,2).

Insgesamt wurde somit in allen drei homologen Kokulturmodellen (GMZ, nRKM bzw. Fib mit MNZ) die Interaktion der Zellen anhand der synergistischen IL-6-Produktion nachgewiesen.

4.5 Einfluss von IL-1 auf die Interaktion im Kokulturmodell

In früheren Untersuchungen war im Kokulturmodell humaner Gefäßmuskelzellen (GMZ) und Monozyten nachgewiesen worden, dass die Interaktion der beiden Zelllinien, und damit die synergistische IL-6-Sekretion, wesentlich durch IL-1 beeinflusst wird. Im folgenden Abschnitt soll daher untersucht werden, ob IL-1 auch für die Zellinteraktion in den Kokulturmodellen der vorliegenden Arbeit von Bedeutung ist. Eingesetzt wurde dazu ein IL-1-Rezeptorantagonist, welcher sowohl an humane als auch murine IL-1-Rezeptoren bindet und so die Wirkung von IL-1 bei der Interaktion der verschiedenen Zellen im Kokulturmodell unterdrücken könnte.

4.5.1 Der IL-1-Rezeptorantagonist vermindert die IL-6-Sekretion in der Kokultur von Gefäßmuskelzellen der Ratte mit humanen mononukleären Zellen

In Kokulturen von GMZ der Ratten-Aorta und humanen MNZ wurde in An- und Abwesenheit des Interleukin-1-Rezeptorantagonist (IL-1-RA) die IL-6-Aktivität untersucht (Abbildung 15). Wie in den vorangegangenen Versuchen mit GMZ der Ratten-Aorta war eine synergistische IL-6-Sekretion in den unstimulierten und stimulierten Kokulturansätzen zu verzeichnen. In Anwesenheit des IL-1-RA war dieser Synergismus deutlich geringer ausgeprägt. Zudem waren die absoluten IL-6-Konzentrationen der Kokulturansätze im Vergleich zu den IL-1-RA-freien Ansätzen deutlich reduziert. In den unstimulierten Ansätzen war eine Reduktion um 43 % zu beobachten, in den LPS-stimulierten Ansätzen eine Reduktion um 52 %. Ein Einfluss von IL-1 auf die Interaktion muriner GMZ mit humanen MNZ kann somit angenommen werden.

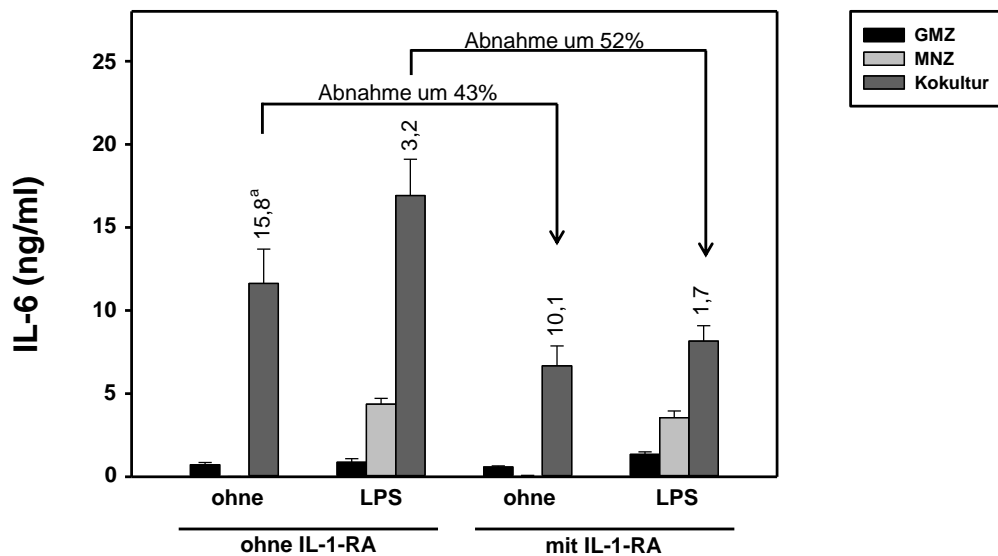


Abbildung 15: In Anwesenheit von Interleukin-1-Rezeptorantagonist (IL-1-RA) sinkt die IL-6-Aktivität in der Kokultur von Gefäßmuskelzellen (GMZ) der Ratte und humanen mononukleären Zellen (MNZ). GMZ der Ratten-Aortenwand (10.000 pro cm²) wurden wie in Abb. 3 beschrieben kultiviert. In die Ansätze wurden humane MNZ (100.000 pro cm²) bzw. Kulturmedium 2 eingebracht. Die Zellen wurden ohne bzw. mit IL-1-RA (300 ng/ml) sowie ohne bzw. mit LPS (100 ng/ml) inkubiert. Die Abnahme der Überstände sowie die Messung der IL-6-Konzentration erfolgten wie in Abb. 3 beschrieben. Alle Messwerte wurden dabei als Quadruplikate angelegt. Dieses Experiment wurde einmal durchgeführt. Die Berechnung und Auswertung der Daten erfolgte wie in Abb. 3 beschrieben. a, Synergismus der Kokulturansätze, wurde als Quotient $IL-6_{Kokultur} / (IL-6_{GMZ} + IL-6_{MNZ})$ berechnet (synergistischer Effekt, wenn Quotient > 1,2).

4.5.2 Der IL-1-Rezeptorantagonist vermindert die IL-6-Sekretion in der Kokultur von Kardiomyozyten der Ratte und humanen mononukleären Zellen

Der Einfluss von IL-1-RA auf die synergistische IL-6 Sekretion wurde auch im Kokulturmodell von Kardiomyozyten neonataler Wistarratten (nRKM) mit humanen MNZ untersucht (Abbildung 16). Hierbei zeigte sich in der stimulierten Kokultur, ähnlich wie in den vorangegangenen Untersuchungen mit nRKM beschrieben, ein synergistischer Effekt. Die IL-6-Aktivität der Kokulturen sank unter Anwesenheit von IL-1-RA deutlich (um 92 %). Weiterhin zeigte sich auch eine deutliche Reduktion des Synergismus. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass auch in diesem Kokulturmodell ein Einfluss von IL-1 auf die Zellinteraktion anzunehmen ist.

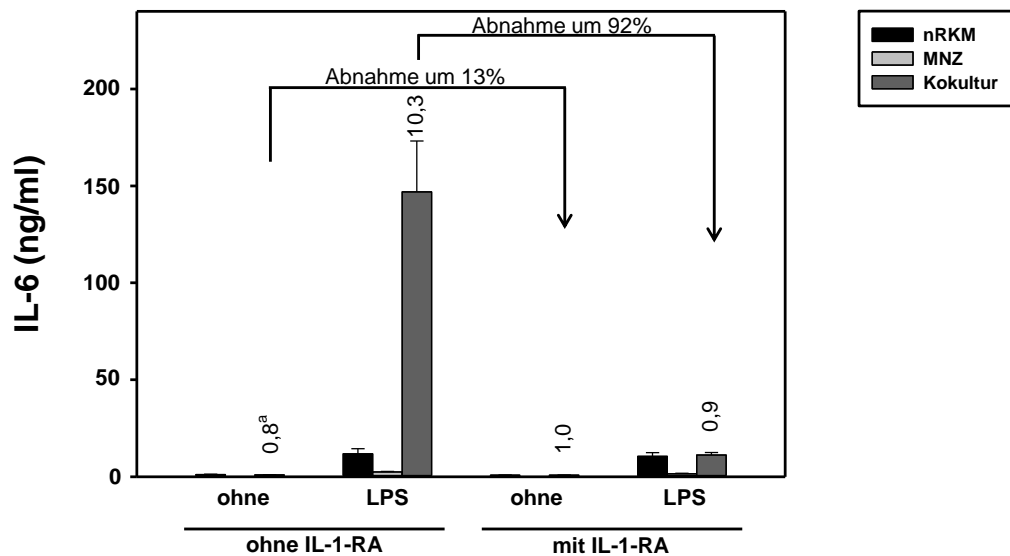


Abbildung 16: In Anwesenheit von Interleukin-1-Rezeptorantagonist (IL-1-RA) sinkt die IL-6-Aktivität in der Kokultur von neonatalen Rattenkardiomyozyten (nRKM) und humanen mononukleären Zellen (MNZ). nRKM (120.000 pro cm²) wurden wie in Abb. 6 beschrieben kultiviert. In die Ansätze wurden humane MNZ (50.000 pro cm²) bzw. Kulturmedium 2 eingebracht. Die Zellen wurden ohne bzw. mit IL-1-RA (300 ng/ml) sowie ohne bzw. mit LPS (100 ng/ml) inkubiert. Die Abnahme der Überstände sowie die Messung der IL-6-Konzentration erfolgten wie in Abb. 3 beschrieben. Alle Messwerte wurden dabei als Quadruplikate angelegt. Dieses Experiment wurde dreimal durchgeführt. Die Berechnung und Auswertung der Daten erfolgte wie in Abb. 3 beschrieben. a, Synergismus der Kokulturansätze, wurde als Quotient $IL-6_{Kokultur} / (IL-6_{nRKM} + IL-6_{MNZ})$ berechnet (synergistischer Effekt, wenn Quotient > 1,2).

4.5.3 Der IL-1-Rezeptorantagonist vermindert die IL-6-Sekretion in der Kokultur von kardialen Fibroblasten der Ratte und humanen mononukleären Zellen

Auch in den Kokulturen von Fibroblasten (Fib) neonataler Wistarratten mit humanen MNZ wurde der Einfluss von IL-1-RA auf die Zellinteraktion untersucht (Abbildung 17). Abgebildet sind hier lediglich die Ergebnisse für die Fib-Konzentration von 30.000 Zellen pro cm². In der LPS-stimulierten Kokultur von Fib mit MNZ zeigte sich die erwartete synergistische IL-6-Produktion. Unter Anwesenheit von IL-1-RA verringerte sich die IL-6-Konzentration um 84 %. Auch der Synergismus wurde in den IL-1-RA-haltigen Kokulturen deutlich reduziert. Eine Versuchsdurchführung mit einer Fib-Konzentration von 10.000 Fib pro cm² erbrachte vergleichbare Ergebnisse. IL-1 beeinflusst also auch in diesem Kokulturmodell die zelluläre Interaktion.

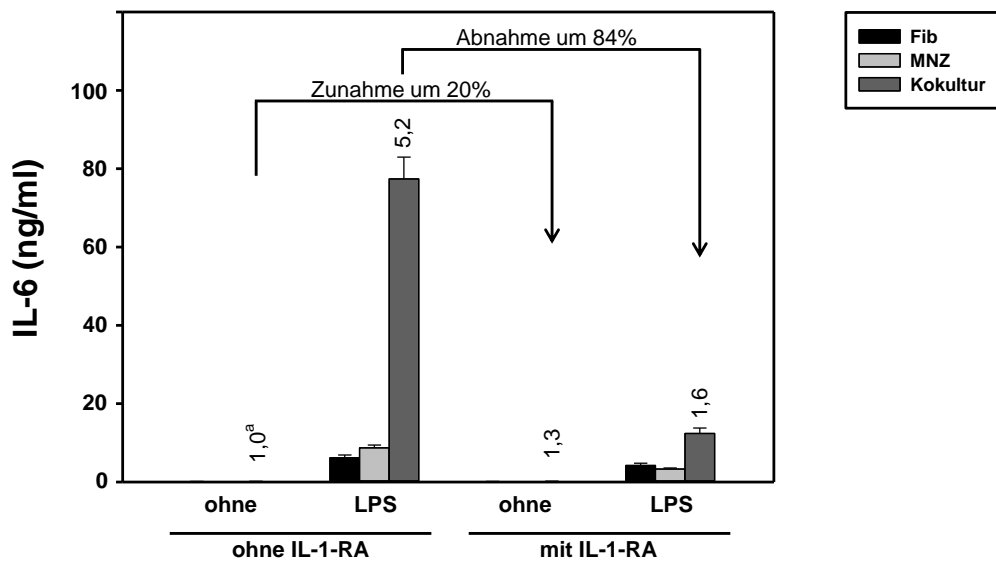


Abbildung 17: In Anwesenheit von Interleukin-1-Rezeptorantagonist (IL-1-RA) sinkt die IL-6-Aktivität in der Kokultur von Fibroblasten (Fib) der Ratte und humanen mononukleären Zellen (MNZ). Aus neonatalen Ratten isolierte kardiale Fib (30.000 pro cm²) wurden wie in Abb. 8 beschrieben kultiviert. In die Ansätze wurden humane MNZ (50.000 pro cm²) bzw. Kulturmedium 2 eingebracht. Die Zellen wurden ohne bzw. mit IL-1-RA (300 ng/ml) sowie ohne bzw. mit LPS (100 ng/ml) inkubiert. Die Abnahme der Überstände sowie die Messung der IL-6-Konzentration erfolgten wie in Abb. 3 beschrieben. Alle Messwerte wurden dabei als Quadruplikate angelegt. Dieses Experiment wurde einmal durchgeführt. Die Berechnung und Auswertung der Daten erfolgte wie in Abb. 3 beschrieben. a, Synergismus der Kokulturansätze, wurde als Quotient $IL-6_{Kokultur} / (IL-6_{Fib} + IL-6_{MNZ})$ berechnet (synergistischer Effekt, wenn Quotient > 1,2).

4.5.4 Der IL-1-Rezeptorantagonist vermindert die IL-6-Sekretion in der Kokultur von Gefäßmuskelzellen und mononukleären Zellen der Ratte

Der Einfluss von IL-1-RA auf die IL-6-Aktivität wurde auch in Kokulturen von GMZ der Ratten-Aorta mit MNZ der Wistar ratte untersucht (Abbildung 18). In Anwesenheit des IL-1-RA zeigte sich eine Reduktion der IL-6-Sekretion in den Kokulturansätzen. In unstimulierter Kokultur betrug die Reduktion dabei im abgebildeten Versuch 10 % und für LPS-stimulierte Kokulturen 50 %. Wie aufgrund der oben beschriebenen Versuche mit Ratten-GMZ erwartet, war eine synergistische IL-6-Sekretion sowohl in unstimulierten als auch in LPS-stimulierten Kokulturen nachweisbar. In Anwesenheit des IL-1-RA zeigte sich im abgebildeten Versuch in beiden Kokulturen eine Verringerung des synergistischen Effektes. Die Zellinteraktion wird also auch in diesem Kokulturmodell durch IL-1 beeinflusst.

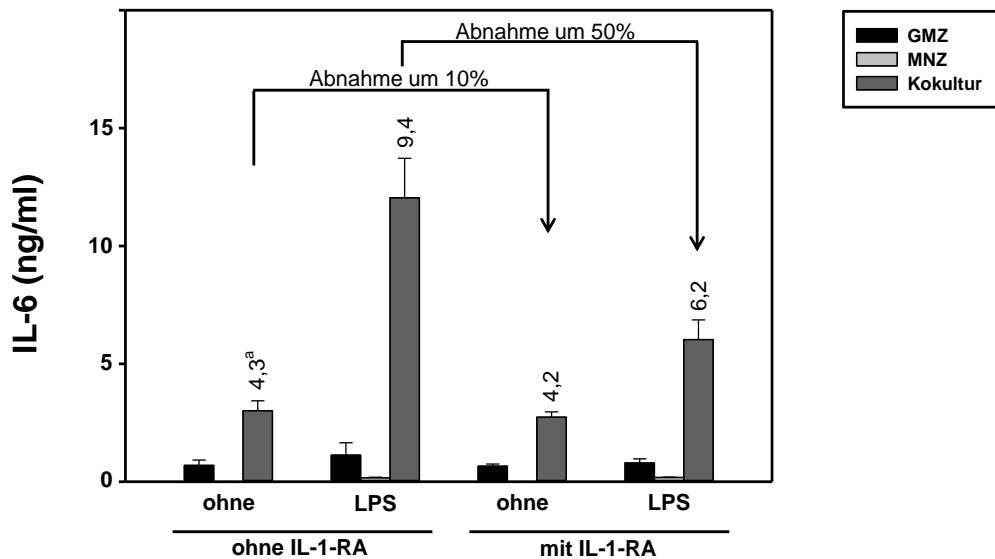


Abbildung 18: In Anwesenheit von Interleukin-1-Rezeptorantagonist (IL-1-RA) sinkt die IL-6-Aktivität in der Kokultur von Gefäßmuskelzellen (GMZ) und mononukleären Zellen (MNZ) der Ratte. GMZ der Ratten-Aortenwand (10.000 pro cm²) wurden wie in Abb. 3 beschrieben kultiviert. In die Ansätze wurden MNZ der Ratte (200.000 pro cm²) bzw. Kulturmedium 2 eingebracht. Die Zellen wurden ohne bzw. mit IL-1-RA (300 ng/ml) sowie ohne bzw. mit LPS (100 ng/ml) inkubiert. Die Abnahme der Überstände sowie die Messung der IL-6-Konzentration erfolgten wie in Abb. 3 beschrieben. Alle Messwerte wurden dabei als Triplikate angelegt. Dieses Experiment wurde zweimal durchgeführt. Die Berechnung und Auswertung der Daten erfolgte wie in Abb. 3 beschrieben. a, Synergismus der Kokulturansätze, wurde als Quotient $IL-6_{Kokultur} / (IL-6_{GMZ} + IL-6_{MNZ})$ berechnet (synergistischer Effekt, wenn Quotient > 1,2).

4.5.5 Der IL-1-Rezeptorantagonist vermindert die IL-6-Sekretion in der Kokultur von Kardiomyozyten und mononukleären Zellen der Ratte

Abschließend wurde der Einfluss von IL-1-RA auf die synergistische IL-6-Sekretion auch in Kokulturen von nRKM und Ratten-MNZ untersucht (Abbildung 19). In Anwesenheit von IL-1-RA zeigte sich eine Reduktion der IL-6-Sekretion in unstimulierter (um 72 %) sowie LPS-stimulierter Kokultur (um 55 %). Weiterhin zeigte sich im abgebildeten Versuch unter Anwesenheit von IL-1-RA eine deutliche Reduktion des Synergismus in Kokultur. IL-1 hat somit Einfluss auf die Vermittlung der zellulären Interaktion in allen getesteten heterologen und homologen Kokulturmodellen.

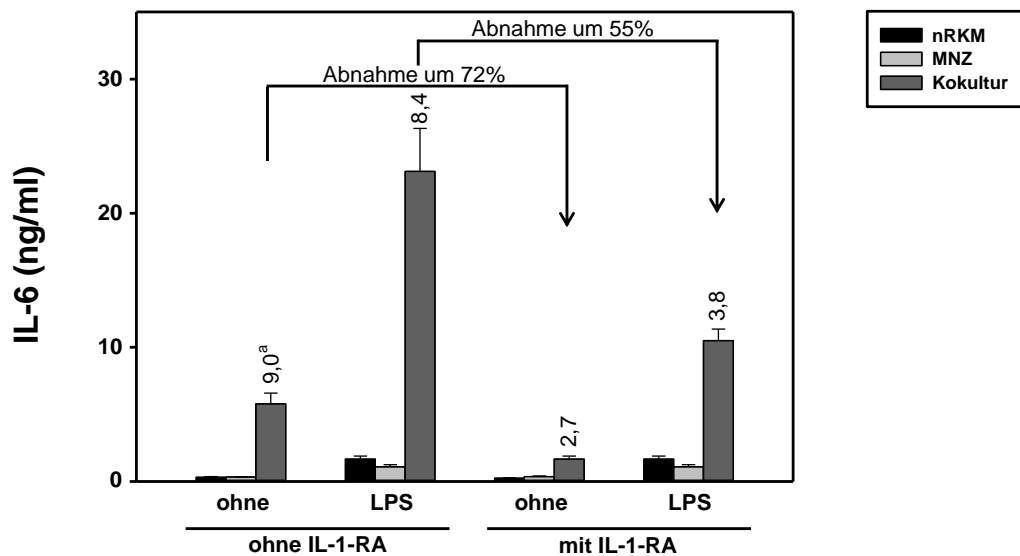


Abbildung 19: In Anwesenheit von Interleukin-1-Rezeptorantagonist (IL-1-RA) sinkt die IL-6-Aktivität in der Kokultur von neonatalen Rattenkardiomyozyten (nRKM) und mononukleären Zellen (MNZ) der Ratte. nRKM (120.000 pro cm²) wurden wie in Abb. 6 beschrieben kultiviert. In die Ansätze wurden MNZ der Ratte (50.000 pro cm²) bzw. Kulturmedium 2 eingebracht. Die Zellen wurden ohne bzw. mit IL-1-RA (300 ng/ml) sowie ohne bzw. mit LPS (100 ng/ml) inkubiert. Die Abnahme der Überstände sowie die Messung der IL-6-Konzentration erfolgten wie in Abb. 3 beschrieben. Alle Messwerte wurden dabei als Triplikate angelegt. Dieses Experiment wurde dreimal durchgeführt. Die Berechnung und Auswertung der Daten erfolgte wie in Abb. 3 beschrieben. a, Synergismus der Kokulturansätze, wurde als Quotient $IL-6_{Kokultur} / (IL-6_{nRKM} + IL-6_{MNZ})$ berechnet (synergistischer Effekt, wenn Quotient > 1,2).

Insgesamt zeigten die Ergebnisse, dass eine IL-1-abhängige Zellinteraktion auch in heterologen und homologen murinen Modellen nachweisbar ist. Diese Systeme könnten daher in weiterführenden mechanistischen Experimenten eingesetzt werden.

5 Diskussion

Atherosklerose ist ein multikausal bedingtes Geschehen [Ross, 1993]. Entzündliche Prozesse sind dabei für die Entstehung und Prognose atherosklerotischer Plaques von entscheidender Bedeutung [Ross, 1999; Libby et al., 2009]. Interaktionen zwischen den Zellen der Gefäßwand beeinflussen wahrscheinlich die lokalen entzündlichen Vorgänge [Loppnow et al., 2011a]. Anhand von Kokulturmodellen können diese zellulären Interaktionen *in vitro* eingehender untersucht werden. Hierbei zeigte sich in der Vergangenheit z.B. eine synergistische Erhöhung der Produktion von Interleukin-6 (IL-6) in Kokulturen von humanen Gefäßmuskelzellen (GMZ) und mononukleären Zellen (MNZ) [Chen et al., 2009]. Diese wird u.a. durch Interleukin-1 (IL-1) vermittelt. In der vorliegenden Arbeit wurde auch in Kokulturmodellen muriner kardiovaskulärer Zellen, wie GMZ, Kardiomyozyten oder Fibroblasten, mit humanen bzw. murinen MNZ eine IL-1-abhängige synergistische IL-6-Produktion nachgewiesen.

5.1 Neben Gefäßmuskelzellen zeigen auch Kardiomyozyten und kardiiale Fibroblasten in Kokulturen mit mononukleären Zellen eine synergistische IL-6-Sekretion

Bereits in früheren Versuchen wurden humane GMZ und MNZ in Kokultur hinsichtlich der Sekretion pro-inflammatorischer Mediatoren, wie beispielsweise IL-6, untersucht [Chen et al., 2009]. Dazu wurden Monokulturen von GMZ bzw. MNZ und Kokulturen beider Zelltypen jeweils ohne bzw. mit Stimulation durch Lipopolysaccharid (LPS), einem integralen Bestandteil der äußeren Zellwand gramnegativer Bakterien, inkubiert. LPS-stimulierte Kokulturen zeigten dabei eine deutlich gesteigerte und im Vergleich zu den Monokulturen synergistische, also überadditive, Sekretion von IL-6. Der Synergismus war dabei bei einem GMZ:MNZ-Verhältnis von 1:2 bis 1:30 am stärksten ausgeprägt, bei einem GMZ:MNZ-Verhältnis von 1:0,5 bis 1:1 zeigte sich ein halbmaximaler synergistischer Effekt. Auch war in der genannten Arbeit eine Hochregulation der IL-6-mRNA in den Kokulturzellen nachweisbar. In anderen Versuchen fand die humane monozytenartige Zelllinie U937 Verwendung, um Zellinteraktionen mit humanen GMZ zu untersuchen [Butoi et al., 2011]. In Kokulturen der GMZ mit LPS-stimulierten Monozyten wurden dabei ebenfalls gesteigerte Mengen an IL-6 nachgewiesen. Weiterhin zeigten getrennte Genexpressionsanalysen der beiden Zelltypen nach Abschluss der Kokultivierung eine Hochregulierung der IL-6-mRNA in den GMZ. Die Untersuchungsergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen in Übereinstimmung mit den oben beschriebenen Versuchen. Homologe humane Kokulturen von GMZ und MNZ zeigten auch hier eine gesteigerte synergistische IL-6-Sekretion.

Zusätzlich wurden in der vorliegenden Arbeit auch heterologe Kokulturen von Aorten-GMZ

von Maus bzw. Wistarratte und humanen MNZ sowie homologe Kokulturen von GMZ und MNZ der Wistarratte untersucht. In diesen Kokulturmodellen war ebenfalls ein Synergismus der IL-6-Sekretion nachweisbar. Während Kokulturen mit Ratten-GMZ, ähnlich wie jene mit humanen GMZ, dabei bereits unstimuliert eine synergistische IL-6-Sekretion zeigten, war ein Synergismus in Kokulturen mit GMZ der Maus-Aorta hingegen nur LPS-stimuliert nachweisbar. Auch zeigten die Maus-GMZ in unstimulierten Monokulturen im Vergleich zu den humanen GMZ und den Ratten-GMZ eine niedrigere IL-6-Basissekretion. Ratten-GMZ wurden mit verschiedenen Konzentrationen humaner MNZ (10.000 bis 400.000 pro cm², entsprechend einem Verhältnis GMZ:MNZ von 1:1 bis 1:40) bzw. muriner MNZ (10.000 bis 500.000 pro cm², entsprechend einem Verhältnis GMZ:MNZ von 1:1 bis 1:50) in Kokultur gebracht. Mit steigender MNZ-Konzentration nahm hierbei die IL-6-Sekretion in unstimulierten und stimulierten Kokulturen zu, wobei sich eine Stagnation der Zunahme der IL-6-Sekretion, beginnend mit einer Konzentration von 500.000 MNZ pro cm², andeutete. In unstimulierten Kokulturen stieg mit steigender MNZ-Konzentration zudem der IL-6-Synergismus, wohingegen dieser in LPS-stimulierten Kokulturen durch die zusätzliche konzentrationsabhängige Zunahme der IL-6-Sekretion in den MNZ-Monokulturen limitiert wurde. Die IL-6-Produktion und der Synergismus waren tendenziell in homologen Kokulturen schwächer ausgeprägt als in heterologen Kokulturen. Zudem zeigten murine MNZ LPS-stimuliert eine geringere IL-6-Sekretion als humane MNZ. Mögliche Ursachen für die geringere Aktivierbarkeit muriner MNZ könnten speziesspezifische Unterschiede sein. Denkbar wäre auch, dass die murinen MNZ durch das angewandte Isolationsverfahren bei der Verwendung der geringeren Blutmengen der Wistarratten stärker beansprucht wurden.

Inflammatorische Zellinteraktionen sind auch innerhalb des Herzgewebes von Bedeutung. Die Akkumulation von Immunzellen ist eine der ersten Reaktionen auf Verletzungen des kardialen Gewebes [Zlatanova et al., 2016]. Es wird angenommen, dass die Freisetzung inflammatorischer Mediatoren durch die beteiligten Gewebe die Koordination des folgenden Regenerationsprozesses übernimmt. Unter diesen Vermittlern der kardialen Regeneration nimmt IL-6 eine essentielle Rolle ein [Han et al., 2015]. Ferner wurde nachgewiesen, dass IL-6 auch am nicht vorgeschädigten Herzen einen Phänotyp induziert, welcher dem bei hypertensiver Kardiomyopathie stark ähnelt [Meléndez et al., 2010]. Frühere Daten unserer Arbeitsgruppe zeigten zudem eine LPS-vermittelte Steigerung der IL-6-Sekretion neonataler Rattenkardiomyozyten (nRKM) [Müller-Werdan et al., 1998]. Dennoch standen Kokulturversuche von Herzzellen und MNZ noch aus. In der vorliegenden Arbeit wurden nRKM sowie kardiale Fibroblasten (Fib) jeweils in Kokulturen mit humanen bzw. Ratten-MNZ untersucht. Sowohl in den heterologen, als auch in den homologen murinen Kokulturen dieser kardialer Zellen mit MNZ war eine synergistische IL-6-Sekretion nachweisbar.

In heterologen Kokulturen von nRKM (murin) und MNZ (human) nahm die IL-6-Sekretion mit steigender MNZ-Konzentration zu. Ein Synergismus der IL-6-Sekretion zeigte sich hierbei in unstimulierten Ansätzen nur bei hohen MNZ-Konzentrationen (300.000 MNZ/cm²), in LPS-stimulierten Ansätzen hingegen bei allen getesteten MNZ-Konzentrationen (10.000 bis 300.000 MNZ/cm²). Heterologe Kokulturen zeigten tendenziell höhere IL-6-Konzentrationen und stärkere Synergismen als homologe Kokulturen. Eine stärkere Aktivierbarkeit humaner MNZ im Vergleich zu murinen MNZ wurde bereits oben in Kokulturen mit GMZ beobachtet und diskutiert. Homologe murine Kokulturen von nRKM und MNZ wurden ebenfalls mit verschiedenen MNZ-Konzentrationen (3.000 bis 500.000 MNZ/cm²) durchgeführt. Dabei variierten die Synergismen, die bei den verschiedenen MNZ-Konzentrationen auftraten, in den einzelnen Experimenten (siehe Abbildung 12). Ursächlich für diese Abweichungen könnte das aufwendige Isolationsverfahren von nRKM bzw. MNZ aus Wistar-Ratten sein. Möglicherweise war hiernach die inflammatorische Aktivität der isolierten Primärzellen in unterschiedlichem Ausmaß beeinträchtigt. Dennoch zeigte die Regressionsanalyse einen starken positiven Zusammenhang zwischen MNZ-Konzentration und Synergismus.

Weiterhin wurden Kokulturen von kardialen Ratten-Fib mit humanen bzw. murinen MNZ untersucht. Auch hier zeigten homologe murine Kokulturen tendenziell eine schwächere IL-6-Produktion und niedrigere Synergismen als heterologe Kokulturen. In den heterologen Kokulturen wurden unterschiedliche MNZ-Konzentrationen eingesetzt. Es zeigte sich auch in diesem Fall eine Zunahme der IL-6-Produktion mit steigender MNZ-Konzentration.

Zusammengenommen verdeutlichen die durchgeführten Kokulturrexperimente die inflammatorische Aktivität von kardiovaskulären Zellen. Kardiomyozyten und kardiale Fib können ebenso wie GMZ in Interaktion mit MNZ eine synergistische IL-6-Sekretion nach LPS-Stimulation hervorrufen. Die Einführung von geeigneten homologen murinen Kokulturmodellen in dieser Arbeit lässt zukünftige mechanistische Untersuchungen am Rattenmodell möglich erscheinen.

5.2 LPS, Chol, IL-1 α und TNF stimulieren in Kokulturen von Kardiomyozyten und mononukleären Zellen eine synergistische IL-6-Sekretion

Die stimulierende Wirkung von LPS auf die IL-6-Sekretion in Kokulturen von humanen GMZ und MNZ wurde bereits in einer Vielzahl von Veröffentlichungen beschrieben [Chen et al., 2009; Butoi et al., 2011; Loppnow et al., 2011b]. Die Kokulturrexperimente der vorliegenden Arbeit bestätigten diese. Weiterhin wurde hier nachgewiesen, dass LPS auch in heterologen und homologen murinen Kokulturen kardialer Zellen mit MNZ die

IL-6-Sekretion stimuliert. Dabei wurden in den heterologen Kokulturen unterschiedliche LPS-Konzentrationen (0,01 ng/ml bis 1.000 ng/ml) eingesetzt. Die maximale IL-6-Produktion wurde dabei in den Kokulturen bei LPS-Konzentrationen von 10 bzw. 100 ng/ml erreicht. Bei 0,1 ng/ml LPS stellte sich der maximale Synergismus der IL-6-Sekretion ein.

Am Beispiel der homologen Kokultur von nRKM und MNZ der Wistar ratte wurde in dieser Arbeit weiterhin der Einfluss anderer potentieller Stimuli untersucht. 25-Hydroxycholesterol (Chol), ein Oxidationsprodukt des endogenen Cholesterols und damit ein zentraler Risikofaktor der Atherosklerose, wurde bereits als starker Induktor einer synergistischen IL-6-Sekretion in humanen GMZ-MNZ-Kokulturen identifiziert **[Fu et al., 2014]**. Chol-stimulierte Kokulturen von murinen nRKM und MNZ zeigten ebenfalls eine ausgeprägte synergistische IL-6-Sekretion. Monokulturen von nRKM bzw. MNZ zeigten hingegen keine gesteigerte IL-6-Sekretion nach Stimulation mit Chol.

In humanen GMZ-MNZ-Kokulturen wurde nachgewiesen, dass die stimulierende Wirkung von LPS auf die synergistische IL-6-Sekretion entscheidend durch die beiden Zytokine Interleukin-1 (IL-1) und Tumornekrosefaktor- α (TNF) vermittelt wird **[Chen et al., 2009]**. IL-1 ist in diesem Kokulturmodell weiterhin auch an der Vermittlung der stimulierenden Wirkung von Chol beteiligt **[Fu et al., 2014]**. Zudem ist seit längerem bekannt, dass GMZ nach Stimulation mit IL-1 bzw. TNF verstärkt IL-6 produzieren **[Loppnow et al., 1990]**. Kulturversuche mit humanen GMZ im Rahmen dieser Arbeit bestätigten dies. Neben dem meist an Zelloberflächen exprimierten IL-1 α gehört IL-1 β zu den Isoformen von IL-1, welche agonistisch an IL-1-Rezeptoren binden **[Lonnemann et al., 1989]**. Kokulturen von GMZ und MNZ mit Endothelzellen, welche durch oxidiertes *Low-density* Lipoprotein und IL-1 β stimuliert wurden, zeigten ebenfalls eine gesteigerte IL-6-Sekretion **[Li et al., 2015]**. In der vorliegenden Arbeit wurde zudem der Einfluss von IL-1 α bzw. TNF auf die IL-6-Sekretion in nRKM-MNZ-Kokulturen geprüft. Die Stimulation mit IL-1 α führte in den Kokulturen, sowie auch in nRKM-Monokulturen, zu einem ausgeprägten Anstieg der IL-6-Sekretion. Der Synergismus der IL-6-Sekretion fiel daher in den IL-1 α -stimulierten Kokulturen entsprechend niedrig aus. Erhöhte TNF-Serumkonzentrationen sind bei einer Reihe von Erkrankungen wie chronischer Herzinsuffizienz, verminderter Ejektionsfraktion des linken Ventrikels, nach ausgeprägter Myokardischämie oder bei Sepsis nachweisbar **[Maury et al., 1989; Levine et al., 1990; Torre-Amione et al., 1996]**. In früheren Untersuchungen zeigten Kardiomyozyten nach Stimulation mit TNF eine erhöhte IL-6-Produktion **[Müller-Werdan et al., 1997]**. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war auch in TNF-stimulierten nRKM-MNZ-Kokulturen eine gesteigerte, synergistische IL-6-Sekretion nachweisbar. Eine weitere Steigerung der IL-6-Sekretion zeigte sich bei kombinierter Stimulation mit IL-1 α und TNF.

Als weiterer potentieller Stimulus wurde Palmitinsäure getestet, welche zu den im Blut zirkulierenden freien Fettsäuren gehört. Diese sind als Risikofaktor kardiovaskulärer Erkrankungen bekannt und mit entzündlichen Prozessen im kardiovaskulären System assoziiert [Soto-Vaca et al., 2013]. Zudem wurde nachgewiesen, dass Palmitinsäure die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie beispielsweise TNF in GMZ induziert [Wu et al., 2014]. Eine Steigerung der IL-6-Sekretion in nRKM-MNZ-Kokulturen war jedoch im Rahmen dieser Arbeit bei Stimulation mit Palmitinsäure nicht nachweisbar. Eingesetzt wurde eine Palmitinsäure-Konzentration, welche in der oben genannten Arbeit in GMZ eine messbare mRNA- und Proteinproduktion von TNF induzierte. Es wäre jedoch denkbar, dass nRKM nicht bzw. erst auf höhere Palmitinsäurekonzentrationen mit einer Produktion von TNF reagieren oder trotz intrazellulärer TNF-Anreicherung dieses in zu geringer Konzentration sezerniert wurde, um in unserem Kokulturmodell eine gesteigerte IL-6-Sekretion auszulösen.

Weiterhin wurde auch der Einfluss von Harnsäure auf die IL-6-Sekretion von nRKM-MNZ-Kokulturen untersucht. Gicht wird in mehreren Veröffentlichungen als eigenständiger Risikofaktor für kardiale Erkrankungen beschrieben [Alderman et al., 1999; Fang et al., 2000; Niskanen et al., 2004]. Nach Stimulation mit Harnsäurekristallen zeigten mononukleäre Zellen eine gesteigerte IL-1 β -Sekretion, welche über Aktivierung des NALP3-Inflammasoms vermittelt wurde [Martinon et al., 2006]. Diese NALP3-Inflammasom-Aktivierung infolge der Stimulation mit Harnsäurekristallen wird in einer Veröffentlichung auch als grundlegender Mechanismus der Gicht-assoziierten koronaren Herzerkrankung bewertet [He et al., 2012]. In Harnsäure-stimulierten Kokulturen von nRKM und MNZ zeigte sich hingegen in der vorliegenden Arbeit keine Steigerung der IL-6-Sekretion. Die eingesetzten Harnsäurekonzentrationen hatten in der oben genannten Veröffentlichung zur nachweisbaren Sekretion von IL-1 β durch THP1-Zellen, einer differenzierten Monozytenzelllinie, geführt. Möglicherweise war die sezernierte IL-1 β -Konzentration dennoch nicht ausreichend, um in unserem Kokulturmodell eine gesteigerte IL-6-Sekretion auszulösen. Weiterhin wäre denkbar, dass die in unseren Modellen eingesetzten undifferenzierten MNZ auf Stimulation mit Harnsäurekristallen weniger sensibel reagieren als THP1-Zellen.

In Kokulturen von Kardiomyozyten und MNZ wurde also durch die Stimulation mit LPS, aber auch durch Chol, IL-1 α und TNF eine gesteigerte IL-6-Sekretion angeregt. Es ist daher anzunehmen, dass neben exogenen Stimuli wie LPS, welches beispielsweise im Rahmen septischer Erkrankungen in den Organismus gelangen kann, auch endogene Substanzen wie das Cholesterol-Oxidationsprodukt Chol oder zentrale Zytokine wie IL-1 und TNF inflammatorische Prozesse im Herzgewebe befeuern können. Insbesondere in LPS- sowie Chol-stimulierten Kokulturen war dabei ein ausgeprägter Synergismus der IL-6-Sekretion auffällig. Dieser verdeutlicht die inflammatorischen Zellinteraktionen

zwischen Kardiomyozyten und MNZ.

5.3 IL-1 ist entscheidend an der Vermittlung der synergistischen IL-6-Sekretion in allen getesteten Kokulturmodellen beteiligt

IL-1 gehört zu den zentralen Mediatoren im Netzwerk der Zytokine [Dinarello, 1998]. Es kann in kardiovaskulären Zellen eine ganze Bandbreite von Funktionen beeinflussen wie beispielsweise die Kontraktilität, Proliferation, Produktion von Zytokinen und Zelloberflächenproteinen, Expression von Adhäsionsmolekülen, Rekrutierung von Blutzellen und sogar den Zelltod [Loppnow et al., 2001]. Neben den beiden Agonisten des IL-1-Rezeptors, IL-1 α und IL-1 β , gehört unter anderem auch der Interleukin-1-Rezeptorantagonist (IL-1-RA) zur IL-1-Familie [Boraschi et al., 2018]. Der IL-1-RA hemmt IL-1 α und IL-1 β kompetitiv, indem er mit ihnen um die Bindung am IL-1-Rezeptor konkurriert, jedoch nach der Rezeptorbindung keine Signalkaskade in Gang setzt [Arend, 1993]. Erhöhte Plasmaspiegel von IL-1-RA wurden unter anderem infolge eines schweren Myokardinfarkts oder einer systolischen Herzinsuffizienz gemessen [Latini et al., 1994; Ikeda et al., 1996]. Beobachtungsdaten, Pilotstudien und präklinische Modelle weisen zudem auf eine förderliche Wirkung einer IL-1-Blockade auf etliche kardiale Pathologien wie Atherosklerose, Atherothrombose, akuten Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz und Perikarditis hin [Van Tassel et al., 2013].

Darüber hinaus zeigte die CANTOS-Studie, dass die Reduzierung kardiovaskulärer Ereignisse durch Canakinumab, einen monoklonalen Antikörper gegen IL-1 β , über den IL-6-Signalweg vermittelt wird [Ridker et al., 2018]. Der Einfluss von IL-1 auf kardiovaskuläre Erkrankungen kann demnach teilweise auch durch die IL-1-induzierte Aktivierung sekundärer Zytokine wie IL-6 oder anderer Mediatoren begründet werden. Zudem wurde nachgewiesen, dass die synergistische IL-6-Sekretion in LPS-stimulierten Kokulturen von GMZ und MNZ entscheidend durch IL-1 vermittelt wird [Chen et al., 2009]. Eine Blockade von IL-1-, TNF- und IL-6-Signalwegen führte sogar zu einer vollständigen Unterdrückung dieses Synergismus. Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe hatten weiterhin gezeigt, dass LPS-stimulierte nRKM funktionales IL-1 α exprimieren [Westphal et al., 2007].

In der vorliegenden Arbeit wurde unter Einsatz von IL-1-RA getestet, inwieweit IL-1 auch an der Vermittlung der zellulären Interaktion in den verwendeten Kokulturmodellen beteiligt ist. Heterologe Kokulturen von murinen GMZ, nRKM bzw. Fib mit humanen MNZ sowie homologe murine Kokulturen von nRKM bzw. Fib mit MNZ wurden untersucht. In allen Modellen zeigte sich unter Anwesenheit von IL-1-RA eine deutliche Abnahme der IL-6-Sekretion in den LPS-stimulierten Kokulturen. Zusätzlich zeigte sich bei Blockade des IL-1-Signalweges in LPS-stimulierten Kokulturen meist auch eine Abnahme des

Synergismus. In Kokulturen von Ratten-GMZ mit MNZ bzw. nRKM mit hohen MNZ-Konzentrationen lag auch unstimuliert eine synergistische IL-6-Sekretion vor. Unter Anwesenheit von IL-1-RA war in diesen unstimulierten Kokulturen ebenfalls eine leicht verminderte IL-6-Sekretion und eine Abnahme des Synergismus nachweisbar. Eine inflammatorische Zellinteraktion findet demnach IL-1-abhängig auch in unstimulierten Kokulturen statt. Je nach Reagibilität der eingesetzten Zellen tritt ein Synergismus der IL-6-Sekretion hierbei bereits bei geringen oder erst bei höheren MNZ-Konzentrationen auf. Eine mögliche Begründung dafür, dass in nRKM-MNZ-Kokulturen erst bei höheren MNZ-Konzentrationen Synergismen auftreten, könnte darin liegen, dass nRKM grundsätzlich in einer höheren Konzentration eingesetzt wurden als GMZ.

IL-1 ist somit beteiligt an der Vermittlung der zellulären Interaktion verschiedener kardiovaskulärer Zelltypen aus Gefäßwand und Herzmuskel mit MNZ, die zu einer synergistischen IL-6-Sekretion führt. Weitere beteiligte Mediatoren zu identifizieren könnte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

5.4 Limitationen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion verschiedener kardiovaskulärer Zellen mit MNZ in Kokulturen untersucht. Während inflammatorische Interaktionen in Kokulturen von GMZ und MNZ vorab bereits in einer Reihe von Veröffentlichungen besprochen worden sind [Zuniga et al., 2014], liegen bisher kaum Untersuchungen von kardialen Zellen in Kokultur mit Immunzellen vor. In dieser Arbeit wurden neben humanen, Maus- und Ratten-GMZ auch Kardiomyozyten und kardiale Fibroblasten neonataler Wistarratten eingesetzt.

In allen untersuchten Kokulturen wurde eine synergistische IL-6-Sekretion nachgewiesen. Ob adulte kardiale Zellen ein vergleichbares Verhalten in Interaktion mit MNZ zeigen, lässt sich anhand dieser Ergebnisse jedoch nicht sagen. Frühere Kokulturversuche von humanen GMZ und MNZ hingegen erlauben einen Abgleich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Hierbei zeigten sich in Kokulturversuchen neonataler GMZ mit MNZ keine wesentlichen Unterschiede zu früheren Versuchen mit adulten GMZ [Chen et al., 2009]. Zudem zeigten in den oben genannten Versuchen homologe humane, heterologe und homologe murine Kokulturen von GMZ und MNZ vergleichbare Ergebnisse. Kardiomyozyten und kardiale Fib wurden in der vorliegenden Arbeit in Kokulturen mit humanen und Ratten-MNZ getestet. Homologe murine und heterologe Kokulturen zeigten dabei ebenfalls vergleichbare Tendenzen. Das legt die Vermutung nahe, dass die nachgewiesene IL-1-abhängige synergistische IL-6-Sekretion bei Interaktion kardiovaskulärer Zellen mit MNZ gleichermaßen in Ratten wie in Menschen auftritt. Das Rattenmodell würde daher eine geeignete Grundlage zur weiteren Erforschung der

zugrunde liegenden Mechanismen darstellen. Homologe humane Kokulturen kardialer Zellen mit MNZ zur Bestätigung wären ethisch allerdings nicht vertretbar.

Alle Kokulturen der vorliegenden Arbeit untersuchen Interaktionen zweier Zelltypen. Inwiefern weitere am Gewebeaufbau von Gefäßwand bzw. Herzmuskel beteiligte Zelltypen diese Interaktionen beeinflussen, wird hierbei jedoch nicht berücksichtigt. Ein Kokulturmodell aus Endothelzellen, GMZ und Monozyten zur Simulation des inflammatorischen Reaktionsprozesses in der atherosklerotischen Gefäßwand wies kürzlich eine erhöhte IL-6-Sekretion bei Stimulation der Kokultur mit oxidiertem *Low-density* Lipoprotein und IL-1 β nach [Li et al., 2015]. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit früheren Kokulturversuchen von GMZ und MNZ unserer Forschungsgruppe, in denen auch ohne Anwesenheit von Endothelzellen IL-1 den IL-6-Synergismus nach Stimulation mit LPS [Loppnow et al., 2011b] bzw. Chol [Fu et al., 2014] vermittelte. Um die Untersuchung verschiedener homologer und heterologer Kokulturmodelle zu ermöglichen, konnten die Experimente dieser Arbeit teilweise nur einmalig durchgeführt werden. Es bedarf weiterer Untersuchungen, um die hier gefundenen Ergebnisse zu bestätigen, das Verständnis der Interaktion kardiovaskulärer Zellen mit MNZ zu vertiefen und ihre Bedeutung in klinischen Studien zu untermauern.

5.5 Ausblick

Die Kokulturversuche, die in der vorliegenden Arbeit vorgestellt wurden, zeigen mögliche inflammatorische Aktivitäten kardiovaskulärer Zellen auf. Ebenso wie GMZ sezernieren auch nRKM und kardiale Fib nach Stimulation mit LPS verstärkt IL-6. Kokulturen dieser kardiovaskulären Zellen mit MNZ zeigen als Ausdruck der interzellulären Interaktion sogar eine synergistische IL-6-Sekretion. Dieser Synergismus wird entscheidend durch IL-1 vermittelt. Da die Akkumulation von Immunzellen eine der ersten Reaktionen nach Verletzung des kardialen Gewebes ist, könnte diese synergistische IL-6-Sekretion besonders infolge einer Schädigung des kardiovaskulären Gewebes von Bedeutung sein. In Kokulturen von nRKM und MNZ wurde ein Synergismus der IL-6-Sekretion auch nach Stimulation mit Chol, IL-1 α oder TNF nachgewiesen. So können neben exogenen Stimuli wie LPS, welches beispielsweise im Rahmen septischer Erkrankungen in den Organismus gelangen kann, auch endogene Substanzen inflammatorische Prozesse im Herzgewebe anregen. Chol gehört dabei als Cholesterol-Oxidationsprodukt zu den zentralen Risikofaktoren der Atherosklerose. Erhöhte Plasmakonzentrationen von IL-1 α oder TNF, beides zentrale pro-inflammatorische Zytokine, liegen unter anderem nach einem Myokardinfarkt oder bei Herzinsuffizienz vor. Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass es insbesondere am vorgeschädigten Herzen aufgrund der vermehrten Präsenz von Immunzellen und von inflammatorischen Zytokinen zur gesteigerten IL-6-Sekretion und damit zur weiteren Verstärkung der entzündlichen Aktivität kommt. Als direkte Folge einer

erhöhten IL-6-Produktion im Herzgewebe könnte dabei ein Umbau des kardialen Gewebes resultieren, wie er bereits am nicht vorgeschädigten Herzen unter erhöhten IL-6-Konzentrationen beobachtet wurde. Es bedarf weiterer Untersuchungen, um die zugrunde liegenden Mechanismen dieser inflammatorischen Zellinteraktionen im kardiovaskulären Gewebe genauer einordnen und ihre klinische Relevanz besser einschätzen zu können. Ein denkbarer nächster Schritt wären Versuche mit transgenen Tieren. In diesen könnte durch gezieltes lokales Ausschalten von inflammatorischen Proteinen, beispielsweise des IL-6- oder IL-1-Signalweges, der Einfluss der Zellinteraktion auf die Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen *in vivo* untersucht werden.

6 Zusammenfassung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellen für Menschen weltweit die häufigste Todesursache dar. Atherosklerose ist hierbei die am häufigsten zugrunde liegende Erkrankung. Forschungen der letzten Jahre konnten die zentrale Bedeutung entzündlicher Prozesse für den Verlauf und die Prognose atherosklerotischer Erkrankungen hervorheben. Im komplexen Zusammenspiel der inflammatorischen Zytokine nimmt Interleukin-6 (IL-6) eine wichtige Rolle ein. So konnte die Serumkonzentration von IL-6 als signifikanter eigenständiger Prognosefaktor für das Auftreten koronarer Herzerkrankungen identifiziert werden. Zellen, welche an der Atherogenese beteiligt sind, wie beispielsweise Monozyten, Endothelzellen und Gefäßmuskelzellen (GMZ), können IL-6 produzieren. Eine Interaktion dieser Zellen im Gewebe könnte die entzündliche Reaktion verstärken. Bei Interaktion humaner Gefäßmuskelzellen mit humanen Monozyten in Kokulturen war ein synergistischer Effekt hinsichtlich der IL-6-Sekretion nachweisbar, welcher unter anderem über Interleukin-1 (IL-1) vermittelt wird.

Auch kardiale Zellen scheinen inflammatorische Prozesse direkt zu beeinflussen. Daher soll in der vorliegenden Arbeit anhand der Sekretion von IL-6 untersucht werden, ob auch Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) oder Herz-Fibroblasten in Kokulturen mit mononukleären Zellen synergistisch IL-6 produzieren. Zudem soll geprüft werden, ob homologe murine Kokulturmodelle von kardiovaskulären Zellen und mononukleären Zellen etabliert werden können und murine Modelle damit eine geeignete Grundlage zukünftiger mechanistischer Untersuchungen beispielsweise mit transgenen Tieren darstellen könnten.

Hierfür wurden Kardiomyozyten, Fibroblasten, Gefäßmuskelzellen bzw. mononukleäre Zellen neonataler Wistarratten und humane Gefäßmuskelzellen bzw. mononukleäre Zellen untersucht. Die IL-6-Konzentration in den Kokulturen wurde mithilfe des 7TD1-Bioassays bestimmt.

Zunächst wurde die synergistische IL-6-Sekretion kokultivierter humaner Gefäßmuskelzellen und mononukleärer Zellen bestätigt. Auch Kokulturen muriner Gefäßmuskelzellen, Fibroblasten oder Kardiomyozyten mit humanen mononukleären Zellen zeigten eine synergistische IL-6-Sekretion. Somit konnte die Zellinteraktion auch im heterologen System dargestellt werden. Schließlich konnte eine synergistische IL-6-Sekretion auch im homologen murinen Kokulturmodell nachgewiesen werden. IL-1 ist dabei für die Interaktion der Zellen von entscheidender Bedeutung. Neben Lipopolysaccharid, welches in allen Kokulturen die synergistische IL-6-Sekretion stimulierte, wurden weitere Stimuli im Kokulturmodell muriner mononukleärer Zellen mit murinen Kardiomyozyten getestet. Hierbei zeigte sich unter Stimulation mit 25-Hydroxycholesterol, IL-1 α oder Tumornekrosefaktor- α ebenfalls eine gesteigerte IL-6-

Sekretion in der Kokultur. Der Synergismus der IL-6-Sekretion nach Stimulierung mit 25-Hydroxycholesterol war dabei deutlich höher als der Synergismus nach LPS-Stimulierung.

Zusammengenommen zeigen die vorliegenden Daten die verstärkte inflammatorische Potenz von kardiovaskulären Zellen, wie Kardiomyozyten und Herz-Fibroblasten, im Kontakt mit mononukleären Zellen in Kokulturen auf. Des Weiteren verdeutlichen die Ergebnisse, dass auch in murinen Modellen der Einfluss zellulärer Interaktion auf die Sekretion von Entzündungsparametern untersucht werden kann. Dies kann eine Grundlage dafür darstellen, zukünftig Zellen genetisch veränderter Tiere einzusetzen, um die Mechanismen der Interaktion genauer zu untersuchen.

7 Literaturverzeichnis

Afanasyeva M, Georgakopoulos D, Rose NR (2004). Autoimmune myocarditis: cellular mediators of cardiac dysfunction. *Autoimmun Rev* 3:476-86.

Aiello RJ, Bourassa PA, Lindsey S, Weng W, Natoli E, Rollins BJ, Milos PM (1999). Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:1518-25.

Alderman MH, Cohen H, Madhavan S, Kivlighn S (1999). Serum uric acid and cardiovascular events in successfully treated hypertensive patients. *Hypertension* 34:144–50.

Arend WP (1993). Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv Immunol* 54:167-227.

Boraschi D, Italiani P, Weil S, Martin MU (2018). The family of the interleukin-1 receptors. *Immunol Rev* 281:197-232.

Braunwald E (1997). Shattuck lecture--cardiovascular medicine at the turn of the millenium: triumphs, concerns and opportunities. *N Eng J Med* 337:1360-9.

Butoi ED, Gan AM, Manduteanu I, Stan D, Calin M, Pirvulescu M, Koenen RR, Weber C, Simionescu M (2011). Cross talk between smooth muscle cells and monocytes/activated monocytes via CX3CL1/CX3CR1 axis augments expression of pro-atherogenic molecules. *Biochimica et Biophysica Acta* 1813:2026-35.

Cesari M, Penninx BW, Newman AB, Kritchevsky SB, Nicklas BJ, Sutton-Tyrrell K, Rubin SM, Ding J, Simonsick EM, Harris TB, Pahor M (2003). Inflammatory markers and onset of cardiovascular events: results from the Health ABC study. *Circulation* 108:2317-22.

Chen L, Frister A, Wang S, Ludwig A, Behr H, Pippig S, Li B, Simm A, Hofmann B, Pilowski C, Koch S, Buerke M, Rose-John S, Werdan K, Loppnow H (2009). Interaction of vascular smooth muscle cells and monocytes by soluble factors synergistically enhances IL-6 and MCP-1 production. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296:H987-96.

Chomarat P, Banchereau J, Davoust J, Palucka AK (2000). IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol* 1:510-4.

Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos JC, Connelly PW, Milstone DS (2001). A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest* 107:1255-62.

Davies MJ (1990). A macro and micro view of coronary vascular insult in ischemic heart disease. *Circulation* 82:II38-46.

Davies MJ (2000). The pathophysiology of acute coronary syndromes. *Heart* 83:361-6.

Dinarello CA (1998). Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int Rev Immunol* 16:457-99.

Fang J, Alderman MH (2000). Serum uric acid and cardiovascular mortality: the NHANES I epidemiologic follow-up study, 1971-1992. *JAMA* 283:2404-10.

Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML (2002). The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 53:31-47.

Frangogiannis NG (2008). The immune system and cardiac repair. *Pharmacol Res* 58:88-111.

Fu H, Spieler F, Großmann J, Riemann D, Larisch M, Hiebl B, Schlecht K, Jaschke C, Bartling B, Hofmann B, Unverzagt S, Koch S, Pilowski C, Simm A, Silber RE, Gielen S, Seliger B, Schlitt A, Ebelt H, Müller-Werdan U, Buerke M, Werdan K, Loppnow H (2014). Interleukin-1 potently contributes to 25-hydroxycholesterol-induced synergistic cytokine production in smooth muscle cell-monocyte interactions. *Atherosclerosis* 237:443-52.

Guillén I, Blanes M, Gómez-Lechón MJ, Castell JV (1995). Cytokine signaling during myocardial infarction: sequential appearance of IL-1 beta and IL-6. *Am J Physiol* 269:R229-35.

Gwechenberger M, Mendoza LH, Youker KA, Frangogiannis NG, Smith CW, Micheal LH, Entman ML (1999). Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions. *Circulation* 99:546-51.

Han C, Nie Y, Lian H, Liu R, He F, Huang H, Hu S (2015). Acute inflammation stimulates a regenerative response in the neonatal mouse heart. *Cell Res* 25:1137-51.

Hansson GK, Libby P (2006). The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 6:508-19.

Harbarth S, Holeckova K, Froidevaux C, Pittet D, Ricou B, Grau GE, Vadas L, Pugin J (2001). Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6, and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 164:396-402.

He J, Yang Y, Peng DQ (2012). Monosodium urate (MSU) crystals increase gout associated coronary heart disease (CHD) risk through the activation of NLRP3 inflammasome. *Int J Cardiol* 160:72-3.

Heinrich PC, Castell JV, Andus T (1990). Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 265:621-36.

Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Scharper F (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374:1-20.

Hojo Y, Ikeda U, Maeda Y, Takahashi M, Takizawa T, Okada M, Funayama H, Shimada K (2000). Interaction between human monocytes and vascular smooth muscle cells induces vascular endothelial growth factor expression. *Atherosclerosis* 150:63-70.

Hunter JD, Doddi M (2010). Sepsis and the heart. *Br J Anaesth* 104:3-11.

Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, Jones S, Horiuchi S, Yamamoto N, Rose-John S, Fuller GM, Topley N, Jones SA (2001). IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity* 14:705-14.

Ikeda U, Yamamoto K, Akazawa H, Hojo Y, Ohkawa F, Fujikawa H, Sekiguchi H, Shimada K (1996). Plasma cytokine levels in cardiac chambers of patients with mitral stenosis with congestive heart failure. *Cardiology* 87:476-80.

Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK (1986). Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* 6:131-8.

Jones SA, Horiuchi S, Yamamoto N, Fuller GM (2001). The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. *FASEB J* 15:43-58.

Jones SA (2005). Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol* 175:3463-8.

Kaperonis EA, Liapis CD, Kakisis JD, Dimitroulis D, Papavassiliou VG (2006). Inflammation and atherosclerosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 31:386-93.

Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnarier C (2003). IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol* 24:25-9.

Kiechl S, Egger G, Mayr M, Wiedermann CJ, Bonora E, Oberhollenzer F, Muggeo M, Xu Q, Wick G, Poewe W, Willeit J (2001). Chronic infections and the risk of carotid atherosclerosis: prospective results from a large population study. *Circulation* 103:1064-70.

Kishimoto T (1989). The biology of interleukin-6. *Blood* 74:1-10.

Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T (1995). Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 86:1243-54.

Latini R, Bianchi M, Correale E, Dinarello CA, Fantuzzi G, Fresco C, Maggioni AP, Mengozzi M, Romano S, Shapiro L (1994). Cytokines in acute myocardial infarction: selective increase in circulating tumor necrosis factor, its soluble receptor, and interleukin-1 receptor antagonist. *J Cardiovasc Pharmacol* 23:1-6.

Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M (1990). Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 323:236-41.

Li Y, Guo Y, Chen Y, Wang Y, You Y, Yang Q, Weng X, Li Q, Zhu X, Zhou B, Liu X, Gong Z, Zhang R (2015). Establishment of an interleukin-1beta-induced inflammation-activated endothelial cell-smooth muscle cell-mononuclear cell co-culture model and evaluation of the anti-inflammatory effects of tanshinone IIA on atherosclerosis. *Mol Med Rep* 12:1665-76.

Libby P, Ridker PM, Hansson GH (2009). Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol* 54:2129–38.

Libby P (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420:868-74.

Lonnemann G, Endres S, Van der Meer JW, Cannon JG, Koch KM, Dinarello CA (1989). Differences in the synthesis and kinetics of release of interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta and tumor necrosis factor from human mononuclear cells. *Eur J Immunol* 19:1531-6.

Loppnow H, Libby P (1990). Proliferating or interleukin 1-activated human vascular smooth muscle cells secrete copious interleukin 6. *J Clin Invest* 85:731-8.

Loppnow H, Westphal E, Buchhorn R, Wessel A, Werdan K (2001). Interleukin-1 and related proteins in cardiovascular disease in adults and children. *Shock* 16:3-9.

Loppnow H, Werdan K, Buerke M (2008). Vascular cells contribute to atherosclerosis by cytokine- and innate-immunity-related inflammatory mechanisms. *Innate Immun* 14:63-87.

Loppnow H, Buerke M, Werdan K, Rose-John S (2011a). Contribution of vascular cell-derived cytokines to innate and inflammatory pathways in atherogenesis. *J Cell Mol Med* 15:484-500.

Loppnow H, Zhang L, Buerke M, Lautenschläger M, Chen L, Frister A, Schlitt A, Luther T, Song N, Hofmann B, Rose-John S, Silber RE, Müller-Werdan U, Werdan K (2011b). Statins potently reduce the cytokine-mediated IL-6 release in SMC/MNC cocultures. *J Cell Mol Med* 15:994-1004.

Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J (2006). Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440:237-41.

Maury CP, Teppo AM (1989). Circulating tumour necrosis factor-alpha (cachectin) in myocardial infarction. *J Intern Med* 225:333-6.

McLoughlin RM, Witkowski J, Robson RL, Wilkinson TS, Hurst SM, Williams AS, Williams JD, Rose-John S, Jones SA, Topley N (2003). Interplay between IFN-gamma and IL-6 signaling governs neutrophil trafficking and apoptosis during acute inflammation. *J Clin Invest* 112:598-607.

Meléndez GC, McLarty JL, Levick SP, Du Y, Janicki JS, Brower GL (2010). Interleukin 6 mediates myocardial fibrosis, concentric hypertrophy, and diastolic dysfunction in rats. *Hypertension* 56:225-31.

Mitani H, Katayama N, Araki H, Ohishi K, Kobayashi K, Suzuki H, Nishii K, Masuya M, Yasukawa K, Minami N, Shiku H (2000). Activity of interleukin 6 in the differentiation of monocytes to macrophages and dendritic cells. *Br J Haematol* 109:288-95.

Müller-Werdan U, Schumann H, Fuchs R, Reithmann C, Loppnow H, Koch S, Zimny-Arndt U, He C, Darmer D, Jungblut P, Stadler J, Holtz J, Werdan K (1997). Tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) is cardiodepressant in pathophysiologically relevant concentrations without inducing inducible nitric oxide-(NO)-synthase (iNOS) or triggering serious cytotoxicity. *J Mol Cell Cardiol* 29:2915-23.

Müller-Werdan U, Schumann H, Loppnow H, Fuchs R, Darmer D, Stadler J, Holtz J, Werdan K (1998). Endotoxin and tumor necrosis factor alpha exert a similar proinflammatory effect in neonatal rat cardiomyocytes, but have different cardiodepressant profiles. *J Mol Cell Cardiol* 30:1027-36.

Murray CJ, Lopez AD (1997). Alternative projections of mortality and disability by cause 1990–2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 349:1498–504.

Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, Palinski W (1997). Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 100:2680–90.

Narimatsu M, Maeda H, Itoh S, Atsumi T, Ohtani T, Nishida K, Itoh M, Kamimura D, Park SJ, Mizuno K, Miyazaki J, Hibi M, Ishihara K, Nakajima K, Hirano T (2001). Tissue-specific autoregulation of the stat3 gene and its role in interleukin-6-induced survival signals in T cells. *Mol Cell Biol* 21:6615-25.

Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P (2004). Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res* 94:1543-53.

Niskanen LK, Laaksonen DE, Nyyssönen K, Alfthan G, Lakka HM, Lakka TA, Salonen JT (2004). Uric acid level as a risk factor for cardiovascular and all-cause mortality in middle-aged men: a prospective cohort study. *Arch Intern Med* 164:1546-51.

Northemann W, Braciak TA, Hattori M, Lee F, Fey GH (1989). Structure of the rat interleukin-6 gene and its expression in macrophage-derived cells. *J Biol Chem* 264:16072-82.

Packard RR, Libby P (2008). Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem* 54:24-38.

Puhakka M, Magga J, Hietakorpi S, Penttilä I, Uusimaa P, Risteli J, Peuhkurinen K (2003). Interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha in relation to myocardial infarct size and collagen formation. *J Card Fail* 9:325-32.

Qiao J-H, Tripathi J, Mishra NK, Cai Y, Tripathi S, Wang XP, Imes S, Fishbein MC, Clinton SK, Libby P, Lusis AJ, Rajavashisth TB (1997). Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteopetrotic mice. *Am J Pathol* 150:1687-99.

Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer MJ, Allen J (1998). Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet* 351:88-92.

Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH (2000). Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* 101:1767-72.

Ridker PM, Libby P, MacFadyen JG, Thuren T, Ballantyne C, Fonseca F, Koenig W, Shimokawa H, Everett BM, Glynn RJ (2018). Modulation of the interleukin-6 signaling pathway and incidence rates of atherosclerotic events and all-cause mortality: analyses from the Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS). *Eur Heart J* 39:3499-507.

Rose-John S (2012). IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *Int J Biol Sci* 8:1237-47.

Ross R, Glomset JA (1973). Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* 180:1332-9.

Ross R (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362:801-9.

Ross R (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-26.

Salameh A, Dhein S. Culture of Neonatal Cardiomyocytes. In: Dhein S, Mohr FW, Delmar M (ed): *Practical Methods in Cardiovascular Research*. Springer, Berlin-Heidelberg, 2005, pp. 568-576.

Schieffer B, Schieffer E, Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Kovanen PT, Kaartinen M, Nussberger J, Harringer W, Drexler H (2000). Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability. *Circulation* 101:1372-8.

Schönbeck U, Mach F, Sukhova GK, Murphy C, Bonnefoy JY, Fabunmi RP, Libby P (1997). Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes: a role for CD40 signaling in plaque rupture? *Circ Res* 81:448-54.

Sehgal PB, Zilberstein A, Ruggieri R, May LT, Ferguson-Smith A, Slate DL, Revel M, Ruddle FH (1986). Human chromosome 7 carries the beta 2 interferon gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:5219-22.

Soeki T, Sata M (2016). Inflammatory Biomarkers and Atherosclerosis. *Int Heart J* 57:134-9.

Soto-Vaca A, Losso JN, McDonough K, Finley JW (2013). Differential effect of 14 free fatty acids in the expression of inflammation markers on human arterial coronary cells. *J Agric Food Chem* 61:10074-9.

Squires CE, Escobar GP, Payne JF, Leonardi RA, Goshorn DK, Sheats NJ, Mains IM, Mingoia JT, Flack EC, Lindsey ML (2005). Altered fibroblast function following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 39:699-707.

Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW (1994). A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 89:2462-78.

Sui X, Tsuji K, Tanaka R, Tajima S, Muraoka K, Ebihara Y, Ikebuchi K, Yasukawa K, Taga T, Kishimoto T, Nakahata T (1995). gp130 and c-Kit signalings synergize for ex vivo expansion of human primitive hemopoietic progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:2859-63.

Tanabe O, Akira S, Kamiya T, Wong GG, Hirano T, Kishimoto T (1988). Genomic structure of the murine IL-6 gene. High degree conservation of potential regulatory sequences between mouse and human. *J Immunol* 141:3875-81.

Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, Oral H, Young JB, Mann DL (1996). Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol* 27:1201-6.

Van Snick J, Cayphas S, Vink A, Uyttenhove C, Coulie PG, Rubira MR, Simpson RJ (1986). Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of a T-cell-derived lymphokine with growth factor activity for B-cell hybridomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:9679-83.

Van Tassell BW, Toldo S, Mezzaroma E, Abbate A (2013). Targeting interleukin-1 in heart disease. *Circulation* 128:1910-23.

Vogel RA (1997). Coronary risk factors, endothelial function, and atherosclerosis: a review. *Clin. Cardiol* 20:426-32.

Wang Z, Newman WH (2003). Smooth muscle cell migration stimulated by interleukin 6 is associated with cytoskeletal reorganization. *J Surg Res* 111:261-6.

Weber KT, Sun Y, Katwa LC, Cleutjens JP, Zhou G (1995). Connective tissue and repair in the heart. Potential regulatory mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 752:286-99.

Werdan K, Erdmann E (1989). Preparation and culture of embryonic and neonatal heart muscle cells: modification of transport activity. *Methods Enzymol* 173:634-62.

Westphal E, Li C, Pilowski C, Koch S, Ebel H, Müller-Werdan U, Werdan K, Loppnow H (2007). Endotoxin-activated cultured neonatal rat cardiomyocytes express functional surface-associated interleukin-1alpha. *J Endotoxin Res* 13:25-34.

Wiedermann CJ, Kiechl S, Dunzendorfer S, Schratzberger P, Egger G, Oberhollenzer F, Willeit J (1999). Association of endotoxemia with carotid atherosclerosis and cardiovascular disease: prospective results from the Bruneck Study. *J Am Coll Cardiol* 34:1975-81.

Willerson JT, Ridker PM (2004). Inflammation as a cardiovascular risk factor. *Circulation* 109:II2-10.

Wollert KC, Drexler H (2001). The role of interleukin-6 in the failing heart. *Heart Fail Rev* 6:95-103.

Wu D, Liu J, Pang X, Wang S, Zhao J, Zhang X, Feng L (2014). Palmitic acid exerts pro-inflammatory effects on vascular smooth muscle cells by inducing the expression of C-reactive protein, inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha. *Int J Mol Med* 34:1706-12.

Yudkin JS, Kumari M, Humphries SE, Mohamed-Ali V (2000). Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis* 148:209-14.

Zhang T, Feng Q (2010). Nitric oxide and calcium signaling regulate myocardial tumor necrosis factor-alpha expression and cardiac function in sepsis. *Can J Physiol Pharmacol* 88:92-104.

Zhang Y, Cliff WJ, Schoefl GI, Higgins G (1993). Plasma protein insudation as an index of early coronary atherogenesis. *Am J Pathol* 143:496-506.

Zhu Y, Hojo Y, Ikeda U, Takahashi M, Shimada K (2000). Interaction between monocytes and vascular smooth muscle cells enhances matrix metalloproteinase-1 production. *J Cardiovasc Pharmacol* 36:152-61.

Zilberstein A, Ruggieri R, Korn JH, Revel M (1986). Structure and expression of cDNA and genes for human interferon-beta-2, a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines. *EMBO J* 5:2529-37.

Zlatanova I, Pinto C, Silvestre JS (2016). Immune Modulation of Cardiac Repair and Regeneration: The Art of Mending Broken Hearts. *Front Cardiovasc Med* 3:40.

Zuniga MC, White SL, Zhou W (2014). Design and utilization of macrophage and vascular smooth muscle cell co-culture systems in atherosclerotic cardiovascular disease investigation. *Vasc Med* 19:394-406.

8 Thesen

1. Die Serumkonzentration von Interleukin-6 (IL-6) stellt einen relevanten prognostischen Faktor für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse dar.
2. Durch Lipopolysaccharid (LPS) stimulierte Gefäßmuskelzellen (GMZ) zeigten eine gesteigerte IL-6-Sekretion.
3. In LPS-stimulierten Kokulturen von GMZ und mononukleären Zellen (MNZ) wurde eine überadditive (synergistische) IL-6-Sekretion nachgewiesen. Dies spricht für eine inflammatorische Interaktion beider Zelltypen.
4. Auch isolierte Kardiomyozyten und kardiale Fibroblasten zeigten LPS-stimuliert eine gesteigerte IL-6-Sekretion.
5. LPS-stimulierte Kokulturen dieser kardialen Zellen mit MNZ zeigten ebenfalls einen Synergismus der IL-6-Sekretion. Daher kann auch hier von einer inflammatorischen Zellinteraktion ausgegangen werden.
6. Interleukin-1 (IL-1) war an der Vermittlung der synergistischen IL-6-Sekretion in allen getesteten Kokulturmodellen beteiligt.
7. Neben dem exogenen Stimulus LPS konnte auch das endogene Abbauprodukt 25-Hydroxycholesterol eine synergistische IL-6-Sekretion in Kokulturen von Kardiomyozyten mit MNZ auslösen.
8. Weiterhin wurde eine gesteigerte IL-6-Sekretion in Kokulturen von Kardiomyozyten und MNZ auch durch inflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α und IL-1 α ausgelöst.
9. Homologe humane, heterologe und homologe murine Kokulturmodelle zeigten vergleichbare Ergebnisse.
10. Tierexperimentelle Studien könnten daher zukünftig für weitergehende mechanistische Untersuchungen beispielsweise anhand muriner Zellen genetisch veränderter Tiere herangezogen werden.

A Anlagen

A.1 Lebenslauf

Name Anne Marie Larisch
Geburtsdatum 23.12.1986
Geburtsort Dresden
Staatsangehörigkeit deutsch

Schulischer Werdegang

1993 – 1997 Grundschule „Canaletto“, Dresden
1997 – 2005 Bertolt-Brecht-Gymnasium, Dresden
06/2005 Allgemeine Hochschulreife
2006 – 2007 Ausbildung zur Medizinisch-technischen Laboratoriumsassistentin,
Berufsfachschule am Klinikum Dresden-Friedrichstadt (ohne Abschluss)

Studium

12/2007 – 12/2010 Studium der Zahnmedizin, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus,
Dresden (ohne Abschluss)
01/2011 – 06/2018 Studium der Humanmedizin, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
08/2013 Erstes Staatsexamen
04/2017 Zweites Staatsexamen
06/2018 Drittes Staatsexamen

Berufstätigkeit

seit 01/2019 Assistenzärztin für Psychiatrie im Städtischen Klinikum Dresden

Dissertation und Publikationen

03/2014 – 09/2014 Experimentelle Arbeit im Rahmen der Dissertation unter Leitung von
Professor Dr. Harald Loppnow an der Universitätsklinik und Poliklinik für
Innere Medizin III der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Direktor:
Professor Dr. med. Daniel Sedding)
2014 Fu H, Spieler F, Großmann J, Riemann D, Larisch M, Hiebl B, Schlecht K,
Jaschke C, Bartling B, Hofmann B, Unverzagt S, Koch S, Pilowski C, Simm
A, Silber RE, Gielen S, Seliger B, Schlitt A, Ebelt H, Müller-Werdan U,
Werdan K, Loppnow H (2014). Interleukin-1 potently contributes to 25-
hydroxycholesterol-induced synergistic cytokine production in smooth
muscle cell-monocyte interactions. *Atherosclerosis* 237: 443-52.

Dresden, den 12. Juni 2019

A.2 Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Dresden, den 12. Juni 2019

A.3 Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, dass ich keine früheren Promotionsversuche mit dieser oder einer anderen Dissertation unternommen habe. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Dresden, den 12. Juni 2019

A.4 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Harald Loppnow für die Überlassung des interessanten Themas, die engagierte Betreuung und die zahlreichen hilfreichen Diskussionen bedanken. Herrn Prof. Dr. Karl Werdan und Frau Prof. Dr. Ursula Müller-Werdan danke ich für die Möglichkeit, im Forschungslabor der Klinik zu arbeiten, und für die Förderung während dieser Arbeit. Dem derzeitigen Lehrstuhlinhaber Prof. Dr. Daniel G. Sedding danke ich für die Unterstützung bei der Einreichung der Arbeit. Meinen besonderen Dank richte ich an Frau Claudia Pilowski und Frau Susanne Koch für die geduldige Einarbeitung in die Arbeitstechniken sowie für die kontinuierliche Unterstützung bei der praktischen Zellkultur-Arbeit. Weiterhin danke ich allen Kollegen für die freundliche Arbeitsatmosphäre, die fachliche Unterstützung und die stete Bereitschaft zu anregenden kritischen Diskussionen.

Nicht zuletzt möchte ich auch ausdrücklich meiner Familie und meinen Freunden für die liebevolle Unterstützung und viele verständnisvolle Gespräche in den vergangenen Monaten und Jahren des Studiums und der Dissertation danken.