

Der Einfluss von Apremilast auf Tumornekrosefaktor- α - aktivierte Endothelzellen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin (Humanmedizin)
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Mark Otto
aus Berlin

Gießen 2025

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Klinik für Dermatologie und Allergologie

Gutachter/in: Prof. Dr. Thilo Jakob
Gutachter/in: Prof. Dr. Ulrich Sachs

Tag der Disputation: 24.11.2025

1	Einleitung.....	1
1.1	Atherosklerose.....	1
1.1.1	Definition und Epidemiologie	1
1.1.2	Risikofaktoren.....	2
1.1.3	Pathophysiologie	3
1.1.3.1	Hypothesen zur Initialisierung der Atherosklerose	3
1.1.3.2	Endothelzellfunktion- und dysfunktion	4
1.1.3.3	Proatherogene Zytokine und Chemokine	6
1.1.3.4	Adhäsion / Transmigration	10
1.1.3.5	NF- κ B-Signalweg in Endothelzellen	14
1.1.3.6	MAPK-Signalweg in Endothelzellen	15
1.1.3.7	Progress der Atherosklerose.....	17
1.2	Atherosklerose und Psoriasis	18
1.2.1	Epidemiologie Psoriasis	18
1.2.2	Pathogenese der Psoriasis.....	19
1.2.3	Assoziation zwischen Atherosklerose und Psoriasis	19
1.3	Phosphodiesterasen.....	21
1.3.1	Definition und Funktion der Phosphodiesterasen	21
1.3.2	Phosphodiesterase-Inhibitoren in der klinischen Anwendung	22
1.3.3	Apremilast (Phosphodiesterase-4-Inhibitor)	23
1.3.3.1	Zulassung in Deutschland für die Psoriasis vulgaris	25
1.3.3.2	Aktuelle Studienlage im Bereich des Metabolischen Syndroms.....	26
1.4	Hypothese und Ziel der Arbeit	28
2	Materialien und Methoden	29
2.1	Materialien.....	29
2.1.1	Allgemeine Reagenzien und Substanzen.....	29
2.1.2	Geräte	30
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	31
2.1.4	Zellen	33
2.1.4.1	Primäre humane Endothelzelllinie: HUVEC	33
2.1.4.2	Humane Monozytenzelllinie: THP-1	33
2.1.4.3	Substanzen und Reagenzien in der Zellkultur.....	34
2.1.5	Antikörper Westernblot.....	35
2.1.5.1	Primäre Antikörper	35
2.1.5.2	Sekundäre Antikörper.....	36

2.1.6	Primer für die RT-PCR.....	36
2.1.7	Gebrauchsfertige Analyse-Kits.....	36
2.1.8	Weitere Materialien.....	37
2.1.9	Software.....	37
2.2	Methodik.....	38
2.2.1	Zellkultur HUVEC.....	38
2.2.1.1	Auftauen und Kultivierung der Zellen.....	38
2.2.1.2	Ernte und Passagieren.....	38
2.2.1.3	Zellzählung.....	39
2.2.1.4	Einfrieren der Zellen.....	39
2.2.1.5	Gewinnung von Zellkulturüberständen.....	39
2.2.1.6	Proteingewinnung.....	40
2.2.1.6.1	Gesamtprotein.....	40
2.2.1.6.2	Zytosolische und nukleäre Proteine.....	41
2.2.1.6.3	Proteinbestimmung nach Lowry.....	41
2.2.1.7	RNA-Isolierung.....	42
2.2.1.7.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA.....	43
2.2.2	Zellkultur THP-1.....	43
2.2.2.1	Auftauen und Kultivierung der Zellen Zellkultur.....	43
2.2.2.2	Ernte und Passagieren.....	44
2.2.2.3	Gewinnung von Zellkulturüberständen und Behandlung.....	44
2.2.3	Ansetzen der Behandlungsreagenzien.....	44
2.2.4	Zytotoxizitätstest.....	45
2.2.5	Proliferationstest.....	46
2.2.6	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) und Zytokin-Array.....	47
2.2.7	Westernblot.....	51
2.2.8	Semiquantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und Kapilläre Gelelektrophorese.....	54
2.2.9	Immunfluoreszenz-Mikroskopie.....	56
2.2.10	Funktionelle Untersuchungen.....	57
2.2.10.1	Adhäsion.....	57
2.2.10.2	Transmigration.....	58
2.2.11	Statistik und Diagramme.....	59
3	Ergebnisse.....	60
3.1	Einfluss von Apremilast und Roflumilast auf Zytotoxizität und Proliferation in Endothelzellen.....	60

3.2	Effekte von Apremilast und Roflumilast auf die TNF α -induzierte Sekretion proatherogener Zytokine	61
3.3	Effekte von Apremilast auf die TNF α -induzierte GM-CSF mRNA-Expression in humanen Endothelzellen	65
3.4	Wirkung von Apremilast auf die TNF α -induzierte Expression endothelialer Adhäsionsrezeptoren	67
3.5	Wirkung von Apremilast auf die TNF α -induzierte Aktivierung der MAPK-Signalwege	69
3.5.1	Effekte auf die MAPK JNK 1/2, ERK 1/2 und p38.....	69
3.5.2	Einfluss der verschiedenen MAPK-Signalwege auf die GM-CSF-Sekretion in aktivierten Endothelzellen	70
3.5.3	Wirkung verschiedener MAPK-Inhibitoren auf die Expression endothelialer Adhäsionsrezeptoren	71
3.6	Wirkung von Apremilast auf die TNF α -induzierte Aktivierung des NF- κ B Signalweges	73
3.6.1	p65-Phosphorylierung im Gesamtprotein.....	73
3.6.2	p65 im nukleären und I κ B α im zytosolischen Protein.....	74
3.6.3	Nukleärer Nachweis von p65 mittels Immunfluoreszenz.....	75
3.6.4	NF- κ B-Aktivierung.....	76
3.6.5	Einfluss eines spezifischen NF- κ B-Inhibitors auf die TNF α -induzierte GM-CSF-Sekretion	77
3.6.6	Einfluss eines NF- κ B-inhibitors auf die Expression endothelialer Adhäsionsrezeptoren	78
3.7	Funktionelle Untersuchungen mit HUVEC und THP-1 Zellen.....	79
3.7.1	Effekt von Apremilast auf die TNF α -induzierte Adhäsion von THP-1-Zellen an HUVEC.....	79
3.7.2	Effekt von Apremilast auf die TNF α -induzierte Transmigration von THP-1-Zellen durch HUVEC.....	80
3.8	Effekt von Apremilast auf die TNF α -induzierte MMP 9-Sekretion in THP-1-Zellen.....	81
3.9	Effekt von Apremilast auf die IL-17A-induzierte Sekretion proatherogener Zytokine.....	82
4	Diskussion.....	83
4.1	Einleitung.....	83
4.2	Vorversuch zur Zytotoxizität und Proliferation	84

4.3	Effekt von Apremilast und Roflumilast auf proinflammatorische Zytokine und Chemokine	86
4.4	Bedeutung von Apremilast auf die Inhibition wichtiger proentzündlicher Signalwege in humanen Endothelzellen.....	90
4.4.1	MAPK.....	90
4.4.2	NF- κ B.....	92
4.5	Wirkungen von Apremilast auf die Endothelzellfunktion unter inflammatorischen Bedingungen.....	96
4.6	MMP-9 Sekretion in Monozyten.....	103
4.7	Effekt von Apremilast auf die IL-17A-induzierte Sekretion proinflammatorischer Zytokine.....	104
5	Zusammenfassung.....	106
6	Summary.....	107
7	Abkürzungsverzeichnis	108
8	Abbildungsverzeichnis	112
9	Tabellenverzeichnis	114
10	Literaturverzeichnis	115
11	Publikationsverzeichnis.....	146
12	Ehrenwörtliche Erklärung.....	147
13	Danksagung.....	148
14	Tabellarischer Lebenslauf	149

1 Einleitung

1.1 Atherosklerose

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Definition

Die Atherosklerose wird definiert als primär chronische Inflammation der Intima von mittleren (z.B. Arteriae coronariae) und großen (z.B. A. carotis communis, A. iliaca) Arterien. Damit einhergehend kommt es zu einer Einlagerung von Lipiden und Infiltration von Zellen des adaptiven Immunsystems, und somit schlussendlich zu einer Verengung der Arterien und deren konsekutiven Folgen, wie z.B. die koronare Herzkrankheit (KHK) oder der ischämische Schlaganfall (Fishbein und Fishbein 2009; Hansson und Hermansson 2011).

Epidemiologie

Die Atherosklerose und ihre Folgeerkrankungen wie die koronare Herzkrankheit (KHK) und der ischämische Schlaganfall gehören zu den weltweit häufigsten Todesursachen im Erwachsenenalter. Nach aktuellen Zahlen der WHO sind Herz-Kreislauferkrankungen wie etwa Herzinfarkte (16%) und Schlaganfälle (11,2%) die häufigsten Todesursachen weltweit (WHO 2020). Insbesondere in den westlichen Industrienationen mit hohem Einkommen und damit assoziiertem Wohlstand zählen kardiovaskuläre Erkrankungen zu den häufigsten Todesursachen (Barquera et al. 2015; Townsend et al. 2016). Insgesamt haben die Prävalenzen für die aufgeführten kardiovaskulären Ereignisse in den vergangenen Jahren weltweit deutlich zugenommen (Barquera et al. 2015; WHO 2018, 2020). Alleine 2020 verstarben an der koronaren Herzkrankheit in Deutschland ca. 147.073 Personen, was 17,4 % aller Todesfälle ausmacht, und am ischämischen Schlaganfall 34.660 Personen, respektive 4,1% (WHO 2020). Beide Todesursachen haben ihren Häufigkeitsgipfel in der älteren Bevölkerung, 93% sind über 65 Jahre (Statistisches Bundesamt 2020). Die zunehmende Industrialisierung und Verbesserung der Lebensbedingungen ist unter anderem mit einer fettreichen Ernährung, Tabakkonsum und geringeren körperlichen Aktivität verknüpft, welche auf die Entstehung der Atherosklerose begünstigend einwirken (Glovaci et al. 2019). Diese epidemiologischen Daten stellen für die moderne medizinische Forschung eine Herausforderung dar und erfordern innovative Therapieansätze zur erfolgreichen Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen.

1.1.2 Risikofaktoren

Die Pathogenese der Atherosklerose ist multifaktoriell. Grundsätzlich kann man diese in beeinflussbare und nicht beeinflussbare Faktoren unterteilen. Zu den beeinflussbaren Faktoren gehören die Dyslipidämie (erhöhtes LDL-Cholesterol, Lipoprotein (a) und Triglyceride, erniedrigtes HDL-Cholesterol), arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Übergewicht (BMI >25 kg/m²), Nikotinabusus, körperliche Inaktivität und ungesunde Ernährung (Diät-induzierter Hyperinsulinismus, ernährungsbedingtes Missverhältnis zwischen Omega-6 und Omega-3 Fettsäuren). Viele dieser Faktoren sind häufig gemeinsam vergesellschaftet. So ist zum Beispiel das Übergewicht häufig die Folge von ungesunder Ernährung und körperlicher Inaktivität. Zu den nicht beeinflussbaren Risikofaktoren gehören das erhöhte Lebensalter, das männliche Geschlecht und die genetische Vorbelastung (Rissanen 1979; Assmann et al. 1999; Kronenberg et al. 1999; Fruchart et al. 2004; Libby et al. 2019).

Metabolisches Syndrom

Eng verknüpft mit den Risikofaktoren der Atherosklerose ist das Metabolische Syndrom (MetS). Es kann als eine Gruppe verschiedener Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen und die Entstehung eines Diabetes mellitus (Typ 2) verstanden werden (Alberti et al. 2009; Saklayen 2018). Die Kriterien für die klinische Diagnose des metabolischen Syndroms variieren leicht je nach Quelle. Sechs verschiedene nationale und internationale Institutionen wie zum Beispiel die „International Atherosclerosis Society“ und die „International Association for the Study of Obesity“ veröffentlichten 2008 eine Stellungnahme für die Kriterien des MetS. Dazu gehören ein erhöhter Hüftumfang (regionalspezifische Angaben), erhöhte Triglyceride (>150 mg/dl), reduziertes HDL (<40 mg/dl für Männer, <50 mg/dl für Frauen), erhöhter arterieller Blutdruck (systolisch >130 mmHg, diastolisch >85 mmHg), und erhöhte Nüchternblutglukosewerte (>100 mg/dL) (Alberti et al. 2009). Die Risikofaktoren für die Entstehung einer Atherosklerose sind nahezu deckungsgleich mit den Kriterien für ein metabolisches Syndrom. Diese Kriterien kommen häufig nicht isoliert vor, sondern sind wie zuvor beschrieben häufig miteinander vergesellschaftet. Die Prävalenz des metabolischen Syndroms ist von Land zu Land unterschiedlich und in der Erhebung der Daten werden verschiedene Kriterien für die Diagnosestellung genutzt. In den USA liegt die Prävalenz bei 37,7% (Aguilar et al. 2015). Als Kriterien wurden 3 oder mehr der oben aufgeführten verwendet. Der kritische Punkt für den Hüftumfang lag hier bei >102 cm für Männer, und >88 cm für Frauen (Aguilar et al. 2015). In einer Metaanalyse von Scuteri und Kollegen lag die Prävalenz in Deutschland bei 18,5%, wenn die Trias aus erhöhten Triglyceriden, Blutdruck und vergrößertem Hüftumfang als Diagnosekriterien einbezogen wurden. Ersetzte man die

erhöhten Triglyceride mit erhöhtem Blutzucker, sank die Prävalenz in Deutschland auf 7,6% (Scuteri et al. 2015). In einer großen prospektiven Studie mit 900.000 Probanden konnte gezeigt werden, dass die Gesamtmortalität für alle Altersgruppen in den BMI-Klassen von 22-25 kg/m² am niedrigsten war. Jede Zunahme des BMI um 5 kg/m² erhöhte die Mortalität um 30% (Gary Whitlock et al. 2009).

1.1.3 Pathophysiologie

1.1.3.1 Hypothesen zur Initialisierung der Atherosklerose

Bereits 1815 postulierte der britische Chirurg Joseph Hodgson, dass es sich bei der Atherosklerose um ein entzündliches Geschehen handelt (Hodgson 1815). Auch Rudolph Virchow führte Studien durch und kam zu der gleichen Idee, dass es sich hier um einen entzündlichen Vorgang handelt, welcher in der Intima beginnt (Virchow 1856). Die ersten detaillierteren Beschreibungen der initialen Vorgänge innerhalb der Atherosklerose lieferten jedoch andere.

Response-to-Injury Hypothese

Zusammen mit John Glomset formulierte Russel Ross 1973, dass eine Schädigung des Endothels die Grundlage für die Entstehung der Atherosklerose ist. In den Untersuchungen wurde beobachtet, dass glatte Muskelzellen auf verschiedene Stimuli in die Intima migrieren und dort proliferieren (Ross und Glomset 1973). In seinem Review fasste er die Faktoren zusammen, die man im Zusammenhang mit der Schädigung vermutete: chronische Hyperlipidämie, Metabolite, Infektionen und mechanische Faktoren, wie den Scherstress (Ross und Glomset 1976).

LDL-Rezeptor Hypothese

Goldstein und Brown formulierten 1979 die Hypothese, dass der Signalweg um den LDL-Rezeptor (Lipoprotein niedriger Dichte) atheroprotektive Eigenschaften besitzt. An den LDL-Rezeptor bindet das LDL, welches dann in die Zellen aufgenommen wird und in Lysosomen zu Cholesterin abgebaut wird. Die atheroprotektive Eigenschaft des LDL-Rezeptors wird durch einen Feedbackmechanismus begründet. Bei ausreichender LDL bzw. Cholesterinaufnahme wird der Rezeptor runterreguliert, und so die Aufnahme reduziert. Durch die hohe Affinität des Rezeptors, wird schon bei niedrigen Blutkonzentrationen das LDL in das Zellinnere aufgenommen. Bei Menschen, vor allem aus der westlichen Welt, liegt der LDL-Plasmaspiegel häufig jedoch über der für den LDL-Rezeptor optimalen Konzentration. Das wiederum führt zu einer LDL-Rezeptor-unabhängigen Aufnahme über den sogenannten Scavengerrezeptor, welcher keinen negativen Feedbackmechanismus besitzt und zur Folge hat, dass bei hohen LDL-

Blutkonzentrationen die Zelle mit LDL übersättigt wird. Dieser Mechanismus führt auf Dauer zur Bildung von proatherogenen Schaumzellen (Goldstein und Brown 1977; Henriksen et al. 1983; Moore und Freeman 2006). Für die Erforschung des Cholesterinmetabolismus erhielten Brown und Goldstein 1985 den Nobelpreis.

Beide Hypothesen lieferten erste wegweisende Erkenntnisse in der Pathophysiologie der Atherosklerose. Die Ideen führten zu einer genaueren Untersuchung der Entstehung und Aufrechterhaltung von Atherosklerose auf die im weiteren Verlauf eingegangen wird. Mittlerweile weiß man, dass beide Hypothesen ihre Berechtigung haben, die Entstehung der Atherosklerose jedoch ein immens, komplexes Wechselwirken aus verschiedenen Risikofaktoren und molekularen Vorgängen ist. Einig ist man sich jedoch mittlerweile, dass am Anfang die Schädigung des Endothels bzw. die endotheliale Dysfunktion steht. Die Endothelzellen sind somit von entscheidender Bedeutung für die Atherosklerose (Vogel 2009; Gimbrone und García-Cardena 2016; Libby et al. 2019).

1.1.3.2 Endothelzellfunktion- und dysfunktion

Endothelzellfunktion

Als Endothel bezeichnet man die innerste Schicht des Blut- und Lymphgefäßsystems. Dadurch steht es in direktem Kontakt mit den wichtigsten Transportsystemen des Körpers, dem Blut und der Lymphe. Laut einer Schätzung geht man davon aus, dass es in seiner Gesamtheit aus ca. 10 Billionen Zellen besteht und ausgebreitet eine Fläche von ca. 4000-7000 m² einnimmt (Knöbl 2006). Entgegen der früheren Meinung, es wäre eine einfache, passive, semipermeable Membran, weiß man heute, dass das Endothel viele physiologische Prozesse reguliert. Als semipermeable Membran nimmt es eine Barrierefunktion ein und ist somit am Austausch von Substanzen, Flüssigkeiten und Zellen beteiligt (Pearson 2000). Eine wichtige Eigenschaft ist die Beteiligung des Endothel an der Regulierung des Vasotonus durch Stickstoffmonoxid (NO) (Rees et al. 1989; Bonetti et al. 2003). Im physiologischen Zustand, verhindert NO außerdem eine Adhäsion der Leukozyten, was dem Endothel antiinflammatorische Effekte zuspricht (Kubes et al. 1991). Auch an der Homöostase des Blutgerinnungssystems ist das Endothel beteiligt, indem es für eine Balance zwischen profibrinolytischen und antithrombotischen Vorgängen sorgt (Wu und Thiagarajan 1996). Als Transportsystem sind die Gefäße, und somit das Endothel als direkte Kontaktfläche an immunologischen und entzündlichen Prozessen beteiligt. Dafür bedarf es jedoch einer Aktivierung des Endothels auf welche im Weiteren eingegangen wird.

Endotheliale Dysfunktion und Inflammation

Der Begriff der endothelialen Dysfunktion beschreibt im Allgemeinen eine Funktionsstörung des Endothels und geht unter anderem mit einer verminderten Fähigkeit zur Vasodilatation einher. Einen weiteren wichtigen Teil der endothelialen Dysfunktion stellt die endotheliale Inflammation dar. Beide können auseinander resultieren bzw. sich gegenseitig bedingen. Neben der Atherosklerose, gibt es weitere Beispiele bei denen die endotheliale Dysfunktion von Bedeutung ist. Dazu gehören akute bzw. chronische Entzündungsgeschehen in der Leber (Volpes et al. 1992), die Multiple Sklerose (Lou et al. 1997), die Rheumatoide Arthritis (Grober et al. 1993) sowie der Diabetes mellitus Typ 2 (Dubsy et al. 2023). Die Risikofaktoren der endothelialen Dysfunktion und Inflammation sind ähnlich der Atherosklerose und des metabolischen Syndroms. Darunter sind erhöhter Bluthochdruck, turbulente Blutströmung, Rauchen, Diabetes Mellitus, eine fettreiche Ernährung bzw. Hypercholesterinämie, körperliche Inaktivität, erhöhtes Alter und eine Imbalance zwischen Sexualhormonen zu finden (Vogel 2009; Gimbrone und García-Cardena 2016). Im klinischen Alltag lässt sich der Grad der endothelialen Dysfunktion durch die Fähigkeit zur Vasodilatation messen. Mittels Applikation verschiedener vasodilatatorischer Reize, wie z.B. Acetylcholin und Adenosin lässt sich dies bestimmen (Halcox et al. 2002). Der wichtigste Mediator für die endothelzellabhängige Vasodilatation ist das Stickstoffmonoxid. Es wird auf zellulärer Ebene davon ausgegangen, dass eine verminderte Bioverfügbarkeit bzw. Produktion von Stickstoffmonoxid eine der Ursachen für die endotheliale Dysfunktion ist (Bonetti et al. 2003). Ludmer und Kollegen beschrieben als erste, dass es einen Zusammenhang zwischen der Atherosklerose und der verminderten Fähigkeit zur Vasodilatation besteht (Ludmer et al. 1986). Auf Ebene der Zellen bzw. Zytokine gibt es ebenfalls verschiedene Aktivatoren der endothelialen Dysfunktion und Inflammation. Dies sind v.a. oxidiertes LDL (oxLDL), $\text{TNF}\alpha$, IL-17 und Lipopolysaccharid beschrieben (Roussel et al. 2010; Griffin et al. 2012; Libby et al. 2019; Wang et al. 2020). Wie bereits erwähnt ist das LDL ein entscheidender Faktor für die Entstehung der Atherosklerose. Durch verschiedene Enzyme wird dieses modifiziert, wie zum Beispiel durch Oxidierung oder Hydrolyse unterschiedlicher Bestandteile des LDL (Pentikäinen et al. 2000). Es wurde gezeigt, dass oxLDL in Endothelzellen die Sekretion proinflammatorischer Chemokine und Zytokine wie z.B. MCP-1 oder IL-6 fördert, und zum anderen zur vermehrten Expression endothelialer Adhäsionsrezeptoren wie z.B. dem vaskulären Zelladhäsionsmolekül 1 (VCAM-1) und dem interzellulären Zelladhäsionsmolekül (ICAM-1) führt (Ou et al. 2009; Wang et al. 2020). Ein weiterer wichtiger Aktivator ist $\text{TNF}\alpha$. $\text{TNF}\alpha$ ist an verschiedenen entzündlichen Prozessen involviert, unter anderem an der Atherosklerose und Psoriasis

vulgaris. TNF α induziert in Endothelzellen die Sekretion zahlreicher proatherogener Chemokine und Zytokine, wie der Granulozyten-Monozyten-Kolonie stimulierende Faktor (GM-CSF), das Monozyten-chemotaktische Protein 1 bzw. CC-Chemokinligand 2 (MCP-1 bzw. CCL2), das interferongamma-induzierte Protein von 10 kDa bzw. das C-X-C-Motiv Chemokin 10 (IP-10 bzw. CXCL10), IL-6, IL-8 und Expression von Adhäsionsrezeptoren wie VCAM-1, ICAM-1 und Endothel-Selektin (E-Selektin) (Ou et al. 2009; Ende et al. 2014; Baliwag et al. 2015; Boehncke und Schön 2015; Wang et al. 2016; Gonzalez-Cantero et al. 2019; Libby et al. 2019; Wang et al. 2020). Ein weiterer Aktivator der endothelialen Inflammation ist IL-17. Es konnte gezeigt werden, dass es in Endothelzellen die Sekretion proatherogener Zytokine wie IL-8 und IL-6 induziert. Auch die vermehrte Expression verschiedener Endothelzellrezeptoren wie VCAM-1 und E-Selektin konnte nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigte ein synergistischer Effekt aus Behandlung mit TNF α - und IL-17 die stärkste proentzündliche Wirkung auf die Endothelzellen (Roussel et al. 2010; Griffin et al. 2012). In den nächsten Kapiteln wird nun genauer auf die zellulären Folgen der endothelialen Inflammation eingegangen. Zum einen die Adhäsionsrezeptoren, welche eine Interaktion mit den Leukozyten gewährleisten und zum anderen proatherogene Chemokine und Zytokine, welche den weiteren pathophysiologischen Prozess der Atherosklerose vermitteln.

1.1.3.3 Proatherogene Zytokine und Chemokine

Allgemein

Zytokin ist ein Oberbegriff für Signalproteine, die von Zellen sezerniert werden und verschiedene Funktionen wahrnehmen. Sie können unter anderem auf die Differenzierung, das Wachstum und die Proliferation von anderen Zellen wirken (Frostegård et al. 1999; Metcalf 2008). Bei Entzündungen nehmen sie eine entscheidende Rolle ein, da sie in der Aktivierung anderer immunologischer Zellen und der Aufrechterhaltung des entzündlichen Milieus beteiligt sind. Auf der Gegenseite wirken einige Zytokine, wie z.B. IL-10 aber auch atheroprotektiv (Tedgui und Mallat 2006). Im chronischen Entzündungsgeschehen der Atherosklerose sind in allen Phasen viele verschiedene Zytokine beteiligt (McLaren et al. 2011). Das Wort Chemokin ist eine Subkategorie der Zytokine und beinhaltet in das griechische Wort Chemotaxis (gr. Chêmeia „Chemie“, altgr. Τάξις „Ordnung, Aufmarsch“). Dies beschreibt die Bewegung von Zellen entlang eines Konzentrationsgradienten. Sie führen dazu, dass Leukozyten wie z.B. Monozyten oder T-Lymphozyten den Weg in das Gewebe finden (McLaren et al. 2011). Zu den wichtigsten pro-atherosklerotischen Chemokinen gehören MCP-1

(CCL2), RANTES (CCL5), IP-10 (CXCL10), Fraktalin (CX3CL1) und IL-8 (CXCL8) (Braunersreuther et al. 2007; Ray und Autieri 2017).

GM-CSF

Der Granulozyten-Monozyten-Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF) gehört zu den sogenannten Kolonie-Stimulierenden Zytokinen. Robert E. Donahue und Kollegen zeigten, dass GM-CSF die Haematopoese anregt. Sie infundierten Javaneraffen rekombinantes GM-CSF und sahen im Blut eine bis zu 7-fach erhöhte Leukozytose im Vergleich zur Kontrollgruppe. Darunter zählen Neutrophile, Eosinophile, Lymphozyten und Monozyten. Auch im Knochenmark der Affen fand man einen erhöhten Zellgehalt vor (Donahue et al. 1986). Eine Verknüpfung zur Atherosklerose stellten Wang und Kollegen bereits 1994 fest. Sie setzten Kaninchen unter eine cholesterinreiche Diät, um atherosklerotische Läsionen zu induzieren. Mittels immunhistochemischen Methoden konnten sie eine vermehrte Expression von GM-CSF in Makrophagen, glatten Muskelzellen und Endothelzellen innerhalb atherosklerotischer Läsionen, im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachten (Wang et al. 1994). In einem Atherosklerose-Mausmodell wurde gezeigt, dass GM-CSF zur Proliferation und Differenzierung von dendritischen Zellen in den Läsionen und zur Rekrutierung von Monozyten beiträgt (Zhu et al. 2009). In Bezug auf die Atherosklerose konnte gezeigt werden, dass GM-CSF an der Differenzierung von Monozyten in Schaumzellen beteiligt ist (Waldo et al. 2008). In einem atherosklerotischen GM-CSF/LDL-Rezeptor Knockout-Mausmodells (GM-CSF^{-/-}, LDLR^{-/-} vs. LDLR^{-/-}) konnte nachgewiesen werden, dass die GM-CSF-defizienten Mäuse eine geringere Progression der Atherosklerose im fortgeschrittenen Stadium aufwiesen. Folglich wurde GM-CSF eine entscheidende Rolle in der Progression von Plaques und somit der Atherosklerose zugesprochen (Subramanian et al. 2015). In Übereinstimmung damit wurde in einer Patientenstudie außerdem gezeigt, dass im Blut zirkulierendes GM-CSF bei Patienten mit instabilen atherosklerotischen Plaques im Vergleich zu Patienten mit stabilen Plaques und der Kontrollgruppe deutlich erhöht war (Zheng et al. 2019).

MCP-1

Monozyten-chemotaktisches Protein 1 (MCP-1), auch CC-Chemokinligand 2 (CCL2) genannt, gehört zur Gruppe der Chemokine. Es wird von verschiedenen Zellen wie Endothelzellen, Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Monozyten gebildet (Aiello et al. 1999; Singh et al. 2021). Bekannt ist seit langem, dass MCP-1 eine chemotaktische Wirkung auf im Blut- und Lymphsystem zirkulierende Immunzellen, wie T-Lymphozyten oder Monozyten besitzt (Carr et al. 1994; Ajuebor et al. 1998; Yadav et al. 2010). Bereits

vor Jahren wurde in Experimenten gezeigt, dass MCP-1 eine wichtige Rolle in der Atherosklerose zukommt. In einem Mausmodell der Atherosklerose (MCP-1^{-/-}, LDL-R^{-/-}) führte die genetische Deletion von MCP-1 zu einer signifikant geringeren Ansammlung von Lipiden und Monozyten in der Gefäßwand im Vergleich zur Kontrollgruppe (MCP-1^{+/+}, LDL-R^{-/-}) (Gu et al. 1998). Ähnliches konnten Aiello und Kollegen feststellen. In Knockoutmäusen (ApoE^{-/-}/MCP-1^{-/-}) führte die genetische Deletion von MCP-1 zu einer verringerten Ansammlung von Monozyten und oxidiertem LDL in der Gefäßwand, mit dem Ergebnis einer verlangsamten Initiierung der Atherosklerose (Aiello et al. 1999). In einer Kohortenstudie boten sich bei denen mit einer subklinischen Atherosklerose höhere MCP-1-Serumspiegel als bei jenen ohne eine Atherosklerose (Basurto et al. 2019). Weiterhin wurden bei Patienten mit histopathologischen Merkmalen von instabilen Plaques (großer Lipidkern, Hämorrhagien innerhalb der Plaques) höhere Serumspiegel von MCP-1 nachgewiesen (Georgakis et al. 2021). Auch in vitro konnten MCP-1 fördernde Effekte auf die Entstehung der Atherosklerose zugeschrieben werden. Durch Stimulation mittels MCP-1 wurde die Adhäsion der Monozytenzelllinie THP-1 (= Tohoku Hospital Pediatrics-1) an Endothelzellen maßgeblich erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe (Hiraoka et al. 2004). All die Versuche unterstreichen die Rolle von MCP-1 innerhalb der Entstehung und Progression der Atherosklerose.

IP-10

Ein weiteres wichtiges Chemokin ist das Interferon-gamma-induzierte Protein von 10 kDa (IP-10) bzw. auch Chemokin 10 vom Motiv C-X-C (CXCL10) genannt. IP-10 wirkt bei verschiedenen tumorösen, autoimmunologischen und entzündlichen Prozessen chemotaktisch auf CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten, und sorgt für eine Migration dieser zum Ort des Entzündungsgeschehens (Karin und Razon 2018). Aber gerade auch im Bereich der Atherosklerose sind fördernde Effekte beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass es vermehrt in humanen atherosklerotischen Läsionen exprimiert wird (Wang et al. 2017). In einem ex vivo Rattenmodell konnten proatherogene Wirkungen von IP-10 nachgewiesen werden. So induzierte IP-10 eine vermehrte Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen in die Intima (Wang et al. 1996). In einem weiteren Knockoutmausmodell (ApoE^{-/-}/Cxcl10^{-/-}) wurde beobachtet, dass die genetische Deletion von IP-10 zu signifikant kleineren intimalen Läsionsflächen führte. Weiterhin zeigte sich eine hemmende Wirkung auf die Akkumulation von CD4⁺-T-Zellen in atherosklerotischen Läsionen (Heller et al. 2006). Die Stimulation von Endothelzellen mit TNF α führt zu einer vermehrten Sekretion von IP-10 (Hillyer et al. 2003; Schwager et al. 2017).

Matrixmetalloproteinase-9

Ein wichtiger Schritt in der Gefäßwandverdickung ist die Migration glatter Muskelzellen in die Intima, woran eine Vielzahl an Zytokinen und Enzymen beteiligt ist (Libby et al. 2019). Darunter finden sich die sogenannten Matrixmetalloproteinasen (MMP) wieder. Das sind Proteinasen, welche unterschiedliche Bestandteile der extrazellulären Matrix spalten können, wie zum Beispiel Kollagene und Gelatine. In der Atherosklerose ist das bei der Migration von Zellen relevant und wirkt sich unter anderem auf die Stabilität der Gefäßplaques aus (Luttun et al. 2004; Libby et al. 2019). In ihrer katalytischen Einheit enthalten sie ein Zink-Bindungsmotiv, was zur Namengebung führte und gleichzeitig Charakteristikum dieser Proteinasen ist (Rodríguez et al. 2010; Chen et al. 2013). Verschiedene Studien konnten belegen, dass die Matrixmetalloproteinase-9, eine Gelatinase, an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt ist. Die MMP-9 wird in atherosklerotischen Läsionen von Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Monozyten sezerniert (Cho und Reidy 2002; Zhang 2022). So konnte durch Galis und Kollegen nachgewiesen werden, dass MMP-9 in atherosklerotischen Läsionen vermehrt exprimiert wird (Galis et al. 1995) und weiterhin entscheidend an der Migration von glatten Muskelzellen in die atherosklerotische Plaque beteiligt ist (Mason et al. 1999; Johnson und Galis 2004). In weiteren Experimenten wurden jedoch auch unterschiedliche Ergebnisse beobachtet. Die Gruppen um Luttun und Kollegen sowie Johnson und Kollegen nutzten beide Knockoutmäuse ($ApoE^{-/-}/MMP-9^{-/-}$) und fütterten diese mit einer zucker- und fettreichen Diät. Luttun und Kollegen beobachteten in der Aorta, dass die Mäuse mit Knockout von MMP-9 kleinere Plaques im Vergleich zur Kontrollgruppe besitzen, und MMP-9 somit entscheidend für die Größe der Plaques ist (Luttun et al. 2004). Johnson und Kollegen konnten in ihren Experimenten jedoch beobachten, dass MMP-9 eher atheroprotektive Wirkungen vermittelt, wie ein kleinerer Plaque und erhöhte Stabilität des Plaques (Johnson et al. 2005). In Linie damit zeigten Jin und Kollegen, dass bei ApoE-defizienten Mäusen, welche bereits über 20 Wochen eine entsprechende proatherogene Diät erhielten, der folgende Knockout von MMP-9 mittels eines Virus, zu stabileren Plaques führte (Jin et al. 2015). Bei *in vitro* Experimenten mittels Gen-Knockdown der MMP-9 in THP-1-Zellen wurde gezeigt, dass die oxLDL-induzierte Bildung von Schaumzellen inhibiert werden konnte (Kojima et al. 2010). Die endgültige Rolle scheint nicht vollständig geklärt.

IL-17A

Das Interleukin-17 ist unterteilt in 6 Isoformen (A-F). Die am häufigsten auf proinflammatorische Wirkungen untersuchte Isoform ist IL-17A. Es wird vor allem von differenzierten CD4⁺-T-Zellen, auch Th17-Zellen genannt, aber auch natürlichen

Killerzellen sezerniert (Miossec und Kolls 2012). Das Interleukin-17 ist vor allem aus der Psoriasis vulgaris (PV) bekannt, wo es ein Schlüsselzytokin in der Pathogenese und einen effektiven Angriffspunkt in der Therapie darstellt (siehe „Pathogenese der Psoriasis“). Aber auch in Bezug auf die Atherosklerose und endotheliale Aktivierung konnten bereits interessante Beobachtungen gemacht werden. IL-17A induziert in Endothelzellen die Sekretion der proatherogenen Zytokine GM-CSF und IL-6 (Fossiez et al. 1996; Erbel et al. 2009). Ebenfalls kommt es unter IL-17A zu einer Hochregulierung der endothelialen Adhäsionsrezeptoren VCAM-1, ICAM-1 und E-Selektin (Roussel et al. 2010). Auf Ebene der Signalwege konnte beobachtet werden, dass die Stimulation mit IL-17A in Endothelzellen zu einer vermehrten Phosphorylierung und Aktivierung von NF- κ B als auch p38 führt (Roussel et al. 2010; Zhang et al. 2021). In vivo wurde in mehreren Mausexperimenten für IL-17A gezeigt, dass es an der Entstehung der Atherosklerose von Bedeutung ist. In einem atherosklerotischen Knockoutmausmodell (ApoE^{-/-}/IL-17^{-/-}) wurde beobachtet, dass die genetische Deletion von IL-17 zu signifikant kleineren atherosklerotischen Plaques führte. Ebenso führte dies zu einer reduzierten Invasion von Makrophagen in die Plaques sowie zur reduzierten Expression proatherogener Zytokine wie beispielsweise MCP-1, IL-6 und IL-1 β (Usui et al. 2012). Ebenfalls beobachtete man in einem Mausmodell, dass die Inhibition von IL-17A, zu einer Reduktion der proatherogenen Zytokine GM-CSF und IL-6 im Plasma führte (Smith et al. 2010).

1.1.3.4 Adhäsion / Transmigration

Die Adhäsionsmoleküle sind bei allen immunologischen und entzündlichen Vorgängen, bei denen eine Migration von Zellen stattfindet, von essentieller Bedeutung. Sie kommen sowohl auf den residenten Zellen (z.B. Endothelzellen), als auch auf den migrierenden Zellen (z.B. Leukozyten) vor, und ermöglichen zwischen diesen eine Interaktion. Es gibt vier große Gruppen: Cadherine, Integrine, Selektine und die Super-Immunoglobulinfamilie (Galkina und Ley 2007; Harjunpää et al. 2019). Sie nehmen in den verschiedenen Schritten der Extravasation von Leukozyten unterschiedliche Funktionen ein. Dazu gehören im ersten Schritt das Rollen am Endothel, die feste Adhäsion, auch Arrest genannt und die Transmigration durch die Endothelzellen.

Rollen

Das sogenannte Rollen ist der erste Schritt in der Interaktion zwischen Endothelzellen und Leukozyten. Die dominierenden Adhäsionsmoleküle bei dem ersten Kontakt sind die Selektine, wozu Lymphozyten-Selektin (L-Selektin), Thrombozyten-Selektin (P-Selektin, P engl. für „platelet“) und Endothel-Selektin (E-Selektin) gehören (Manka et al. 2001; Smith 2008).

L-Selektin wird nur auf Leukozyten und nicht auf Endothelzellen exprimiert. Man geht davon aus, dass die Expression von L-Selektin auf bereits rollenden Lymphozyten dazu führt, dass weitere, noch frei zirkulierende Lymphozyten an diese binden können (Eriksson et al. 2001b). Zur Induktion von atherosklerotischen Läsionen in Mäusen wurden verschiedene Modelle entworfen. Eines ist die Apolipoprotein-E-defiziente Maus. Apolipoprotein-E führt zu einer Aufnahme von Blutfetten in die Leber, um eine Übersättigung dieser im Blut zu verhindern. Durch das Ausschalten des Gens, kommt es bei einer fett- und zuckerreichen Diät der Mäuse zu atherosklerotischen Läsionen (Emini Veseli et al. 2017). In einem atherosklerotischen Mausmodell (ApoE^{-/-}, L-sel^{+/-}) konnte gezeigt werden, dass die Deletion von L-Selektin, keinen Einfluss auf das Rollen der Leukozyten hatte und sogar die atherosklerotische Läsionsfläche vergrößerte (Rozenberg et al. 2011).

Dass P-Selektin und E-Selektin eine deutlich wichtigere Rolle in der Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen einnehmen ist seit Jahren bekannt. P-Selektin bindet auf den Leukozyten vor allem an den P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1), und E-Selektin an den PSGL-1 und E-Selektin Ligand-1 (ESL-1) (Galkina und Ley 2007). In diversen Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass E- und P-Selektin vermehrt in humanen atherosklerotischen Läsionen exprimiert werden. P-Selektin imponierte jedoch eher in früheren und E-Selektin in späteren Läsionen (Davies et al. 1993; Johnson-Tidey et al. 1994). Die Arbeitsgruppe um Dong und Kollegen zeigte schon 1998 in einem Mausmodell mit genetischer Deletion von P- bzw. E-Selektin, wurde im Anfangsstadium der Atherosklerose, während der Ausbildung der sog. „Fettstreifen“, eine deutliche Verringerung der Läsionsfläche im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt. (Dong et al. 1998). Weiterhin konnte mittels Inhibition von P-Selektin und E-Selektin durch Antikörper in Mäusen eine Erhöhung der Flussgeschwindigkeit von Leukozyten induziert werden, was zu einem abgeschwächten Rollen der Leukozyten an der Endothelzellschicht führt (Eriksson et al. 2001a). Klassische Aktivatoren *in vitro* für P- und E-Selektin auf Endothelzellen sind TNF α und oxLDL (Gebuhrer et al. 1995; Ou et al. 2009; Ende et al. 2014; Chang et al. 2014).

Adhäsion

Die feste Adhäsion, welche auch als Zellarrest bezeichnet wird, ist der zweite Schritt in der Gefäßwandinfiltration der Leukozyten. Als wichtigste Vertreter endothelialer Adhäsionsmoleküle sind hier VCAM-1 und ICAM-1 zu nennen, welche beide zur Immunoglobulinsuper-Familie gehören (Davies et al. 1993; Chia 1998). Die Rezeptoren

binden auf den Monozyten unterschiedliche Liganden, welche den Integrinen zuzuordnen sind. Das Adhäsionsmolekül VCAM-1 bindet an das Very-late-Antigen-4 (VLA-4), welches in der CD-Klassifikation („cluster of differentiation“) auch CD49d/CD29 genannt wird. CD49d steht dabei für die α_4 -Untereinheit und CD29 für die β_1 -Untereinheit (Alon et al. 1995; Yusuf-Makagiansar et al. 2002; Liu et al. 2015). ICAM-1 hingegen bindet auf Monozyten an das Leukocyte-function-associated-antigen-1 (LFA-1), und wird in der CD-Klassifikation als CD11a/CD18 bezeichnet. CD11a steht für α -Untereinheit, und CD18 für die β_2 -Untereinheit (Yusuf-Makagiansar et al. 2002). Dass VCAM-1 und ICAM-1 eine Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose spielen, entdeckten 1993 Davies und Kollegen. Sie konnten zeigen, dass beide Rezeptoren auf Endothelzellen in humanen atherosklerotischen Läsionen vermehrt exprimiert wurden (Davies et al. 1993). Die Relevanz der endothelialen Adhäsionsrezeptoren wurde in Mausexperimenten von verschiedenen Gruppen untersucht. So zeigten Cybulsky und Kollegen mit Knockout-Mäusen (LDLR^{-/-}, VCAM-1^{-/-}), dass VCAM-1 für die Entstehung früher atherosklerotischer Läsionen ein wichtiger Faktor ist (Cybulsky et al. 2001). Huo und Kollegen isolierten aus Knockout-Mäusen (ApoE^{-/-}) atherosklerotische Arterien und untersuchten ex vivo die Adhäsion einer Monozytenzelllinie unter antikörpervermittelter Blockierung von VCAM-1. Die Adhäsion wurde dadurch signifikant reduziert, und die Rollgeschwindigkeit erhöht (Huo et al. 2000). Auch Ramos und Kollegen konnten dies in einem ähnlichen Modell beobachten (Ramos et al. 1999). Auch ICAM-1 wurde in verschiedenen Experimenten eine tragende Rolle zugeschrieben. Eine antikörpervermittelte Blockierung von ICAM-1 in einem Mausmodell (ApoE^{-/-}) zeigte, dass die Einwanderung von Monozyten in allen Phasen der Atherosklerose reduziert wurde (Patel et al. 1998). Auch Bourdillon und Kollegen konnten durch ihr Modell mit Knockout-Mäusen (ApoE^{-/-}, ICAM-1^{-/-}) beobachten, dass eine signifikant kleinere Läsionsfläche in den Mäusen mit genetisch deletiertem ICAM-1 im Vergleich zur Kontrolle vorlag (Bourdillon et al. 2000). Auch in Zellkulturexperimenten konnte man ICAM-1 und VCAM-1 mit Blick auf die Interaktion zwischen Endothelzellen und Monozyten essentielle Funktionen nachweisen. Ronald und Kollegen untersuchten wie eine antikörpervermittelte Blockade von ICAM-1 oder VCAM-1 in humanen aortalen Endothelzellen, die Morphologie von THP-1-Zellen in Co-Kultur verändert. Sie fanden heraus, dass sowohl die Blockade von ICAM-1 als auch VCAM-1, die THP-1 dazu veranlasste, weniger Ausläufer, sog. Pseudopoden und Lamellopoden, zu bilden, welche eine breitere Adhäsionsfläche bilden (Ronald et al. 2001). Die Expression auf Endothelzellen wird vor allem durch oxLDL und TNF α stimuliert (Ou et al. 2009; Ende et al. 2014; Chang et al. 2014).

Transmigration

Die Transmigration stellt den letzten und kritischen Schritt in der Einwanderung der Leukozyten dar. Die Interaktion verschiedener Gruppen von Adhäsionsmolekülen ist hier von besonderer Bedeutung. Das Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül (PECAM-1, engl. für „Platelet endothelial cell adhesion molecule“) gehört zur Immunoglobulin-Superfamilie und wird sowohl auf Endothelzellen als auch Leukozyten exprimiert. Es sorgt unter anderem für eine Adhäsion zwischen den Endothelzellen, indem es homophile Bindungen mit sich selbst eingeht (Albelda et al. 1991). In vitro wurde gezeigt, dass die antikörpervermittelte Inhibition von PECAM-1, die TNF α -induzierte transendotheliale Migration von Monozyten aus peripherem Blut (PBMC) reduziert. Die Adhäsion wurde jedoch nicht beeinflusst und die nicht migrierten Monozyten akkumulierten auf den Endothelzellen (Muller et al. 1993). Im Mausmodell (ApoE^{-/-}, PECAM-1^{-/-}) konnte gezeigt werden, dass die Deletion von PECAM-1 die atherosklerotische Läsionsfläche, im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich verringerte. Außerdem wurde in den Knockoutmäusen eine verringerte VCAM-1-Expression und p65 Translokation in den Nuclei unter Ausschaltung von PECAM-1 beobachtet (Harry et al. 2008). Interessanterweise wird PECAM-1 durch Stimulation mit TNF α insgesamt nicht vermehrt oder vermindert exprimiert, sondern ändert seine Lage auf der Zelloberfläche. Es wird nicht mehr an den Gap-Junctions exprimiert, sondern an der Basis der Zellen und kann so keine Barrierefunktion mehr einnehmen. (Romer et al. 1995; Eppihimer MJ et al. 1998).

Eine weitere Gruppe von Adhäsionsmolekülen zwischen den Endothelzellen sind die junctionales Adhäsionsmoleküle (JAM). Sie gehören wie PECAM-1 zur Immunoglobulin-Superfamilie und werden im Bereich der Tight Junctions, am apikalen Zellpol, exprimiert (Martin-Padura et al. 1998). Man findet sie jedoch auch auf Epithelzellen, Leukozyten und Thrombozyten (Mandell und Parkos 2005). Im engeren Sinne gehören drei verschiedene Proteine zur JAM-Familie: JAM-A, JAM-B und JAM-C. Ihre hauptsächliche Funktion auf Endothel- und Epithelzellen ist die Schaffung einer Barriere und Polarität. Dies erreichen sie durch homophile und heterophile Bindungen und über ihre intrazelluläre Komponente, welche mit intrazellulären Proteinen wechselwirken (Garrido-Urbani et al. 2014). Für alle JAM wurde eine Relevanz in der Transmigration von Leukozyten beschrieben, im Folgenden wird jedoch speziell auf JAM-A eingegangen (Martin-Padura et al. 1998; Ozaki et al. 1999; Schmitt et al. 2014; Garrido-Urbani et al. 2014). Für JAM-A konnte man unter TNF α -Stimulus, bzw. kombiniert mit INF- γ , keine vermehrte Expression feststellen. Vielmehr findet eine Umverteilung statt, sodass JAM-A immunhistologisch nicht mehr an den interzellulären Zell-Zellkontakten lokalisiert ist

und somit die Barrierefunktion der Endothelzellen eingeschränkt wird (Martin-Padura et al. 1998; Ozaki et al. 1999). Auch das proatherogene oxLDL bewirkt eine Umverteilung von JAM-A, was zu einer erhöhten Adhäsion und Transmigration von Leukozyten führt (Schmitt et al. 2014). Stimmig mit diesen Ergebnissen, konnte man in vitro durch antikörpervermittelte Inhibierung von JAM-A, eine Reduktion der Transmigration von Monozyten durch Endothelzellen erreichen (Martin-Padura et al. 1998).

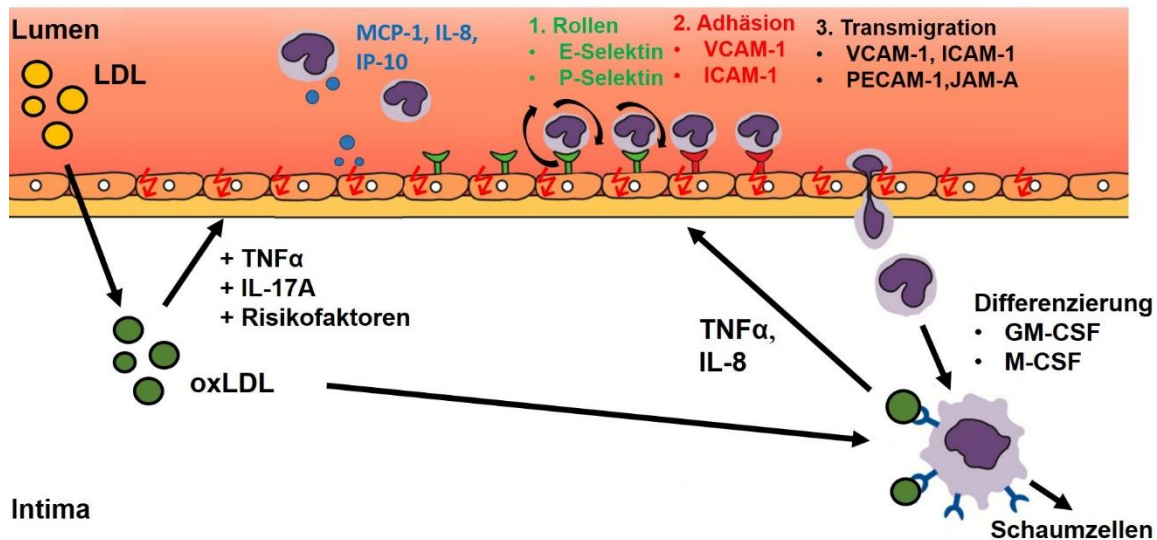


Abb. 1.1: Initiierung der Atherosklerose. In einem proentzündlichen Milieu kann LDL zu oxidiertem LDL umgewandelt werden und mit anderen Entzündungsmediatoren wie TNF α und IL-17A zu einer proatherogenen Aktivierung des Endothels führen. Zum einen kommt es daraufhin zur Sekretion verschiedener Zytokine (z.B. MCP-1, IL-8, IP-10), welche unter anderem als Chemoattraktantien wirken, und zum anderen zur Ausbildung verschiedener endothelialer Adhäsionsrezeptoren (wie z.B. E-Selektin, VCAM-1, ICAM-1, PECAM und JAM-A). All diese Mechanismen vermitteln die verstärkte transvaskuläre Einwanderung von Monozyten und T-Lymphozyten, als wichtigen Meilenstein in der Entstehung der Atherosklerose. (nach Nguyen et al. 2019).

1.1.3.5 NF- κ B-Signalweg in Endothelzellen

NF- κ B ist die Abkürzung für „nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells“. Der Name ist zurückzuführen auf die Entdeckung in B-Lymphozyten, wo NF- κ B als Transkriptionsfaktor für die κ -Kette der Immunglobuline wirkt (Sen und Baltimore 1986). In vielen weiteren Studien konnte belegt werden, dass NF- κ B in nahezu allen Zelltypen vorhanden ist und dort als Transkriptionsfaktor für Prozesse wie Proliferation, Apoptose und entzündliche Reaktionen verantwortlich ist (Lawrence 2009; Mulero et al. 2019). NF- κ B besteht aus fünf Untereinheiten: p65 (RelA), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p105 als Proform, prozessiert zu p50) und NF- κ B2 (p100 als Proform, prozessiert zu p52) (Serasanambati und Chilakapati 2016). NF- κ B kann in Endothelzellen durch verschiedene Stimuli, wie TNF α , IL-1 β oder Lipopolysaccharid (LPS) aktiviert werden

(Gerhardt et al. 2015; Wang et al. 2016). Die einzelnen Untereinheiten lagern sich daraufhin zu Heterodimeren zusammen und binden dann an NF- κ B-spezifische DNA-Motive, um dann als Transkriptionsfaktoren zu wirken (Hoesel und Schmid 2013). Die Aktivierung von NF- κ B ist ein komplexer Ablauf, da dieser über eine iatrogene Inhibition von NF- κ B reguliert wird. In nicht entzündlich aktivierten Zellen sorgen Regulatorproteine der I κ B-Familie dafür, dass NF- κ B inaktiviert vorliegt. Dabei bindet I κ B vor allem die p50 und p65 Untereinheiten von NF- κ B und verhindert somit eine Translokation von Zytoplasma in den Zellkern. Weiterhin wird durch I κ B die nukleäre Bindungssequenz maskiert (Jacobs und Harrison 1998; Mulero et al. 2019). Durch verschiedene aktivierende Stimuli für NF- κ B (z.B. TNF α und LPS) kommt es zur konsekutiven Aktivierung der I κ B-Kinasen, welche zur Phosphorylierung der I κ B-Familie führt und den proteasomalen Abbau von I κ B-Proteinen induziert, welche nun nicht mehr inhibierend auf NF- κ B wirken können (Jacobs und Harrison 1998; Tan et al. 1999; Hoesel und Schmid 2013). Das meistuntersuchte Mitglied der I κ B-Familie ist I κ B α . Der TNF α -Stimulus führt zu einer raschen, aber transienten Degradation von I κ B α (Brown et al. 1995; Gerhardt et al. 2015).

Die Rolle von NF- κ B in Endothelzellen im Rahmen der Atherosklerose und entzündlichen Prozessen wurde in diversen Studien belegt. Gareus und Kollegen nutzten ein klassisches Atherosklerose-Mausmodell (ApoE^{-/-}) und inhibierten zusätzlich spezifisch NF- κ B in den Endothelzellen der Maus. Dabei wurde beobachtet, dass die Mäuse mit der endothelzellspezifischen Inhibition von NF- κ B deutlich kleinere Läsionsflächen als die Kontrollgruppe besaßen (Gareus et al. 2008). In vitro konnte außerdem gezeigt werden, dass die TNF α -induzierte NF- κ B-Aktivierung in Endothelzellen zu einer Ausbildung wichtiger Adhäsionsmoleküle wie E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1 führt. Funktionell führte dies zu einer vermehrten Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen (Read et al. 1995; Zhou et al. 2007; Zhong et al. 2012; Xiao et al. 2020).

1.1.3.6 MAPK-Signalweg in Endothelzellen

„Mitogen activated protein kinases“ (MAPK) sind intrazelluläre Serin/Threonin-Kinasen, die an einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt sind. Sie wirken über die Regulierung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren, welche daraufhin beispielsweise aktiviert werden und in den Zellkern translozieren. Dadurch können sie zelluläre Prozesse wie Apoptose, Differenzierung, Wachstum, Embryogenese, aber auch die entzündliche Aktivierung modulieren (Kyriakis und Avruch 2001; Sun et al. 2015). Der MAPK-Signalweg besteht aus mehreren nacheinander geschalteten Kinasen die wiederum die nächste phosphorylieren und somit aktivieren.

In dieser Kaskade sind mindestens die MAPK-KK, MAPK-K und MAPK beteiligt. Zu den bekanntesten und meistuntersuchten MAPK gehören die extrazellulär-signal-regulierten Kinasen 1/2 (ERK1/2 = p42/44), p38 und die c-Jun N-terminale Kinasen bzw. stress-aktivierte-phospho Kinasen 1/2 (JNK 1/2). Weitere sind ERK 5, ERK 3, ERK 4, ERK 7/8 und NLK (Cargnello und Roux 2011; Arthur und Ley 2013; Sun et al. 2015). Im Folgenden wird auf Rolle von ERK1/2, JNK1/2 und p38 in der entzündlichen Aktivierung von Endothelzellen, speziell in Bezug auf proatherogene Faktoren eingegangen.

ERK1/2

Die MAPK ERK1/2 wird physiologisch v.a. durch Wachstumsfaktoren, wie z.B. dem Epidermal Growth Factor (EGF) oder dem Platelet Derived Growth Factor (PDGF) aktiviert. Die führt zu Proliferation und Differenzierung von Zellen (Sun et al. 2015). Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass ERK1/2 an der entzündlichen Aktivierung von Endothelzellen beteiligt ist. Durch spezifische Inhibierung von ERK1/2 in TNF α -aktivierten Endothelzellen konnte die Sekretion von MCP-1 reduziert werden (Gerhardt et al. 2015). In entzündlich aktivierten, glatten Muskelzellen wurde gezeigt, dass ERK1/2 entscheidend an der Sekretion von MMP-9 beteiligt ist. Auch die Arbeit von Zhong und Kollegen zeigt eindrücklich, dass ERK1/2 an der TNF α -induzierten Expression von VCAM-1 und ICAM-1 auf Endothelzellen beteiligt ist (Zhong et al. 2012). Die Effekte von ERK1/2 auf VCAM-1 und ICAM-1 konnten auch auf mRNA-Ebene gezeigt werden (Wang et al. 2016). Wang und Kollegen zeigten in vitro, dass ERK1/2 ebenfalls in funktionellen Untersuchungen proatherogene Effekte vermittelt. Die Inhibierung von ERK1/2 in TNF α -aktivierten Endothelzellen führte zu einem verminderten Adhärenzen von Monozyten an die Endothelzellen (Wang et al. 2016).

JNK1/2

JNK1/2 wird vor allem durch zellulären Stress wie Hitze, Hypoxie und Ischämie oder proinflammatorische Zytokine, wie z.B. TNF α , aktiviert. Es wirkt bei der Proliferation und Differenzierung, ist jedoch v.a. in Apoptose und entzündliche Geschehen eingebunden. (Cargnello und Roux 2011; Gerhardt et al. 2015). In Bezug auf proinflammatorische Zytokine konnte gezeigt werden, dass durch Inhibition von JNK1/2 in TNF α -aktivierten Endothelzellen unter anderem die Sekretion von GM-CSF, MCP-1, IL-8 reduziert werden konnte. Laviola und Kollegen konnten in TNF α -aktivierten Endothelzellen zeigen, dass durch Inhibition von JNK1/2 die Expression von E-Selektin reduziert wurde. Dieser Effekt wurde durch Inhibition von ERK1/2 nicht gezeigt (Laviola et al. 2013). Im Vergleich zur ERK-Inhibition, konnte die Inhibition von JNK1/2 die TNF α -induzierte Expression von VCAM-1 und ICAM-1 nicht reduzieren (Wang et al. 2016).

p38

Die MAPK p38 wird ebenfalls durch verschiedene proinflammatorische Stimuli wie TNF α oder LPS aktiviert (Wang et al. 2016; Koga et al. 2016). Außerdem wurde in humanen aortalen Endothelzellen durch spezifische Inhibition von p38, die LPS-induzierte IL-6 und IL-8 Sekretion reduziert (Wang et al. 2011). Auf Ebene der Adhäsionsmoleküle wurde gezeigt, dass durch spezifische Inhibition von p38 die Expression von VCAM-1 in TNF α -aktivierten Endothelzellen gehemmt wurde, jedoch nicht die von ICAM-1 (Nizamutdinova et al. 2012). Auch die Expression von E-Selektin in TNF α -aktivierten Endothelzellen wird u.a. durch p38 vermittelt (Westra et al. 2005). Interessanterweise konnte in einer anderen Arbeit gezeigt werden, dass in TNF α -stimulierten Endothelzellen eine spezifische Inhibition von p38 zu einer vermehrten Expression von ICAM-1 führt (Pietersma et al. 1997). Auch funktionell wurde *in vitro* gezeigt, dass durch Inhibition von p38 in TNF α -aktivierten Endothelzellen die Adhäsion von Monozyten reduziert war (Wang et al. 2016).

1.1.3.7 Progress der Atherosklerose

Neben der endothelialen Dysfunktion ist die Rekrutierung von Zellen des erworbenen Immunsystems essentiell für die Pathogenese der Atherosklerose. Nachdem Monozyten in die Tunica Intima des Gefäßes eingewandert sind, differenzieren diese zu Makrophagen. An dieser Differenzierung sind verschiedene Zytokine maßgeblich beteiligt (wie z.B. M-CSF und GM-CSF) (Smith et al. 1995; Waldo et al. 2008; Itoh et al. 2020). Die Makrophagen fördern ein proinflammatorisches Milieu, welches unter anderem über die Hochregulation von Pattern-Recognition Rezeptoren (PRRs), wie Scavenger-Rezeptoren und Toll-like Rezeptoren (TLRs) sowie über die vermehrte Sekretion diverser proentzündlicher Zytokine (wie z.B. IL-6 und 8) bedingt wird. Über die Scavenger-Rezeptoren nehmen die Makrophagen vermehrt oxidiertes LDL auf, was zur Bildung von Schaumzellen (Goldstein und Brown 1977; Moore und Freeman 2006) führt. Die Akkumulation dieser Schaumzellen führt zum makroskopischen Bild der sogenannten „Fatty streaks“ (Fettstreifen) (Janeway und Medzhitov 2002). Zusätzlich zur Infiltration von Monozyten bzw. Makrophagen, migrieren auch Th1-Lymphozyten in die Intima. Die Einwanderung der glatten Muskelzellen, welche parallel zur Monozyteninfiltration abläuft, führt im Verlauf zur pathologischen Verdickung der Intima (Janeway und Medzhitov 2002; Gimbrone und García-Cardena 2016; Fan und Watanabe 2022). Mit Voranschreiten der Atherosklerose entstehen sogenannte Fibroatherome. Diese besitzen eine relativ dicke fibröse Kappe und einen Lipidkern. Die fibröse Kappe wird von glatten Muskelzellen gebildet, welche von einer Proteoglykanmatrix umgeben sind

und diese damit stabilisieren (Virmani et al. 2000). Darunter befindet sich eine zellfreie Ansammlung von u.a. freiem Cholesterin und Proteoglykanen. Aufgrund der dicken fibrösen Kappe werden sie als sog. stabile Plaques bezeichnet, welche die Perfusion in dem Gefäß maßgeblich einschränken und somit z.B. zu chronischen KHK führen können (Gimbrone und García-Cardeña 2016). Der lipidreiche Lipidkern, kann sich nekrotisch umwandeln. Dies entsteht zu einem durch das Auskristallisieren des Cholesterins in den Zellen und zum anderem über proapoptotische Mediatoren wie z.B. die Perforine, die von zytotoxischen T-Zellen ausgeschüttet werden (Gimbrone und García-Cardeña 2016; Libby et al. 2019). Wenn sich das Gleichgewicht zwischen Aufbau und Abbau der extrazellulären Matrix (EZM), der Schaumzellen und der fibrösen Kappe zugunsten des Abbaus verschiebt, wird der Plaque instabil und droht zu rupturieren (Badimon und Vilahur 2014; Libby et al. 2019). In weiterer Folge können sich daraus kardiovaskuläre Ereignisse, wie z.B. das akute Koronarsyndrom oder der ischämische Schlaganfall entwickeln.

1.2 Atherosklerose und Psoriasis

1.2.1 Epidemiologie Psoriasis

Die Psoriasis vulgaris (PV), ist eine systemische, chronisch-entzündliche Autoimmunkrankheit, welche klassischerweise die Haut und Gelenke betrifft. Allerdings hat die Relevanz der PV als Systemerkrankung in den vergangenen Jahren an Bedeutung gewonnen. In großen Metaanalysen zur epidemiologischen Lage schätzte man weltweit ca. 2% Betroffene. Damit gehört die PV zu einer insgesamt häufigen Erkrankung, mit hoher sozioökonomischen Relevanz (Parisi et al. 2013; Michalek et al. 2017). In der Häufigkeitsverteilung bestehen global deutliche Unterschiede. In Ländern mit durchschnittlich höherem Einkommen, wie z.B. den USA liegt eine deutlich höhere Prävalenz vor, als in Ländern mit niedrigerem Einkommen, wie z.B. Tansania. Das gleiche Verteilungsmuster der Prävalenzen findet sich auch für die Atherosklerose und das metabolische Syndrom (Parisi et al. 2013; Michalek et al. 2017). Die PV findet sich primär an der Haut, charakteristischerweise an den Streckseiten der Extremitäten, aber auch an der behaarten Kopfhaut (Psoriasis capitis) oder den intertriginösen Bereichen (Psoriasis intertriginosa). Es finden sich scharf begrenzte, rote Plaques mit weißer Schuppung. Diese können vereinzelt oder in Gruppen vorkommen. Weiterhin kann ein Befall der Nägel (Onychodystrophia psoriatica) oder Gelenke (Psoriasis arthropathica) vorliegen. Charakterisch ist der Gelenkbefall eines Fingerstrahls (Daktylitis), Entzündungen der Sehnen und Sehnenscheiden (Enthesitis), seltener der axiale Befall

der Wirbelsäule. Die genannten Erscheinungsformen der Psoriasis können einzeln oder in Gruppen auftreten (Schön und Boehncke 2005).

1.2.2 Pathogenese der Psoriasis

Die Initiierung der PV ist Gegenstand aktueller Forschung und nicht endgültig erklärt. In der Pathogenese spielen viele verschiedene Zellen, Rezeptoren, genetische Varianten und Zytokine eine wichtige Rolle. Bisher wurde gezeigt, dass plasmazytoide prädendritische Zellen (engl. plasmacytoid predendritic cells, PDC) die präpsoriatische Haut infiltrieren (Nestle et al. 2005). Daraufhin werden diese durch einen Komplex aus dem antimikrobiellen Peptid LL37 und daran gekoppelte DNA-Komplexe aktiviert (Lande et al. 2007). Durch die Aktivierung kommt es zu einer Produktion von $IFN\alpha$, welches wiederum zur Aktivierung von dermalen dendritischen Zellen führt (Rendon und Schäkel 2019). Diese wandern dann u.a. in die Lymphknoten und führen über IL-12 und IL-23 zu einer Differenzierung von naiven T-Zellen in TH17- und TH1-Zellen. Zurück am Ort der Läsion sezernieren die TH17-Zellen vor allem IL-17, IL-22 und $TNF\alpha$ und die TH1-Zellen vornehmlich $IFN-\gamma$ (Baliwag et al. 2015; Ogawa et al. 2018). IL-17 führt synergistisch mit $TNF\alpha$ zur entzündlichen Aktivierung und Hyperproliferation von Keratinozyten mit dem Resultat der klinisch charakteristischen hyperkeratotischen Plaques sowie zur Ausbildung von Adhäsionsrezeptoren auf Endothelzellen mit konsekutiver Einwanderung weiterer Immunzellen wie z.B. neutrophiler Granulozyten, Makrophagen oder weiterer T-Lymphozyten. Weiterhin induziert IL-17 die Bildung antimikrobieller Peptide, wirkt als Chemoattraktant auf neutrophile Granulozyten und induziert vermehrte Angiogenese (Heidenreich et al. 2009; Boehncke und Schön 2015). Die aktivierten Keratinozyten wiederum sezernieren vermehrt IL-6 und IL-8, welche die Entzündung aufrechterhalten. Für $TNF\alpha$ und IL-17 wurde gezeigt, dass diese nicht nur vermehrt in psoriatischen Läsionen exprimiert werden, sondern auch in erhöhter Konzentration im Blut zirkulieren, verglichen mit gesunden Kontrollgruppe (Takahashi et al. 2010; Ovcina-Kurtovic und Kasumagic-Halilovic 2022). Zusammenfassend liefern diese Daten Hinweise dafür, dass die PV eine Systemerkrankung ist und möglicherweise ein wichtiger Co-Faktor für die Initiierung der Atherosklerose ist.

1.2.3 Assoziation zwischen Atherosklerose und Psoriasis

In den letzten Jahren kam immer häufiger die Frage auf, ob die PV und die Atherosklerose miteinander assoziiert seien und ob es ähnliche Risikofaktoren gibt. Eine große retrospektive Studie aus dem nationalen Krankheitsregister aus Israel mit 46.095 Psoriasispatienten und 1.579.037 Personen in der Kontrollgruppe zeigte, dass Patienten mit einer Psoriasis signifikant häufiger an einer Atherosklerose leiden. Gleiches zeigte

sich für den Diabetes mellitus Typ 2 (Shapiro et al. 2007). Zu dem gleichen Schluss kommen weitere Studien (Fang et al. 2016; Gonzalez-Cantero et al. 2019). Ebenfalls konnte eine Assoziation zwischen der PV und dem Metabolischen Syndrom (MetS) gezeigt werden. In einer großen Metaanalyse mit insgesamt 1,521 Millionen Personen litten 25.042 Personen an einer PV. Psoriasispatienten erfüllten zu 31,4% die dort aufgeführten Kriterien für ein MetS, Personen ohne PV nur zu 21,9%. In den verschiedenen Studien der Metaanalyse wurden unterschiedliche Kriterien für das MetS verwendet. Am häufigsten fanden sich die der „International Atherosclerosis Society“ und die „International Association for the Study of Obesity“. Bei drei von fünf der Kriterien wurde von ein MetS diagnostiziert (erhöhter Hüftumfang, erhöhte Triglyceride, reduziertes HDL, erhöhter arterieller Blutdruck und erhöhte Nüchternblutglukosewerte) (Rodríguez-Zúñiga und García-Perdomo 2017). Ebenfalls zeigte sich in einer weiteren Metaanalyse mit ca. 201.831 Psoriasispatienten, dass diese deutlich häufiger an Übergewicht litten, als nicht erkrankte (Armstrong et al. 2012). Diese Erkenntnisse und Zusammenhänge sind wichtig um eventuelle Komorbiditäten besser erkennen und daraufhin therapieren zu können. Verschiedene in der Therapie der Psoriasis zugelassene Systemtherapeutika zeigten unterschiedliche Ergebnisse in Bezug auf kardiovaskuläre Risikofaktoren und Ereignisse, wie dem Myokardinfarkt. Exemplarisch soll hier auf zwei Biologika eingegangen, zu denen es aktuell die meisten Daten in Zusammenhang auf die Atherosklerose und das metabolische Syndrom gibt.

Die ersten eingesetzten Biologika in der Therapie der PV waren TNF α -Inhibitoren wie z.B. Adalimumab. In einer retrospektiven Kohortenstudie bei Personen mit einer PV, konnte man bei den mit Adalimumab behandelten beobachten, dass diese signifikant niedrigeres Risiko hatten einen Myokardinfarkt zu erleiden, als die andere Gruppe, welche lediglich eine topische Therapie erhielt (Wu et al. 2012). In einer weiteren Studie an 33 Patienten mit Adalimumab-Behandlung über 52 Wochen wurden verschiedene metabolische und entzündliche Parameter erfasst. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion von zirkulierendem IL-6, einem systemischen Inflammationsparameter. Jedoch zeigte sich keine Wirkung auf proatherogene Faktoren wie LDL oder Triglyceride (Mehta et al. 2018). In einer weiteren Studie mit verschiedenen TNF α -Antikörpern wie Adalimumab, Etanercept oder Infliximab, wurde ebenfalls kein signifikanter Effekt auf die Faktoren des MetS wie LDL, Gesamt-Cholesterol oder Triglyceride nachgewiesen. Unter Therapie mit Adalimumab wurde sogar eine signifikante Zunahme des BMI beobachtet (Saraceno et al. 2008). Ein weiteres Biologikum ist Secukinumab, ein monoklonaler Antikörper gegen IL-17A. In mehreren Phase-III-Studien mit insgesamt 3010 behandelten Patienten, welche über 52 Wochen mit 300 mg s.c. alle 4 Wochen

behandelt worden sind, wurden verschiedene metabolische Parameter bestimmt. Es zeigte sich unter der Therapie eine leichte Reduktion des BMI. Interessanterweise wirkte sich Secukinumab jedoch nicht auf die Fettstoffwechselfparameter, LDL und HDL, noch auf den Nüchternblutglukosewert aus (Gerdes et al. 2020). Die Gruppe von Stebut und Kollegen konnte zeigen, dass unter Therapie mit Secukinumab die endotheliale Funktion (Messung der Vasodilatation) bei Patienten mit PV deutlich verbessert werden konnte (Stebut et al. 2019). Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass die Atherosklerose mit der PV assoziiert scheint und die Therapie der PV möglicherweise positive Effekte auf die endotheliale Funktion als auch auf die Atherosklerose vermittelt.

1.3 Phosphodiesterasen

1.3.1 Definition und Funktion der Phosphodiesterasen

Phosphodiesterasen (PDE) sind hochkonservierte, intrazelluläre Enzyme, welche die sekundären Botenstoffe zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) hydrolysieren und zu AMP bzw. GMP abbauen. Die PDE werden in 11 Isotypen unterteilt, welche jeweils in über 40 weitere Isoenzyme aufgeteilt sind. Dabei ist bekannt, dass die Phosphodiesterasen 1, 2, 3, 10 und 11 cAMP und cGMP, die Phosphodiesterasen 5, 6 und 9 nur cGMP und die Phosphodiesterasen 4, 7 und 8 nur cAMP hydrolysieren (Conti und Beavo 2007; Lomas und Zaccolo 2014). Sie sind ähnlich aufgebaut, und bestehen grundsätzlich aus einer katalytischen Domäne, welche im Bereich der Carboxylgruppe lokalisiert ist, und einer regulatorischen Domäne, welche im Bereich des Amino-Terminus lokalisiert ist (Conti und Beavo 2007; Calamera et al. 2022). Phosphodiesterasen werden in verschiedenen Geweben wie dem Herz, den Muskeln, der Niere, der Haut oder dem Gehirn, aber auch in Endothelzellen und Immunzellen wie T-Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Monozyten exprimiert (Lugnier 2006).

Phosphodiesterase 4

Die Phosphodiesterase 4 wurde erstmalig 1987 charakterisiert. Reeves und Kollegen zeigten, dass Rolipram eine cAMP-spezifische Phosphodiesterase in menschlichem Herzhomogenat hemmt. Dies war insofern interessant, da sich dies zu den bis dahin anderen drei bekannten Phosphodiesterasen unterschied, die auch cGMP hydrolysierten, weshalb man diese als Phosphodiesterase 4 benannte (Reeves et al. 1987). Die Phosphodiesterase 4-Familie besteht aus vier verschiedenen Subtypen (A-D), für die jeweils unterschiedliche Gene kodieren (Bolger et al. 1993). Durch Splicing der Transkripte können bis zu 20 Isoformen entstehen (1-9), z.B. die PDE4A1.

Unterscheiden lassen sich die PDE4 zu den anderen PDE's durch ihre regulatorischen Domänen, die „upstream conserved region 1“ (UCR1) und die „upstream conserved region 2“ (UCR2) (Johnston et al. 2004).

Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP)

Das cAMP ist ein ubiquitär vorkommender, sekundärer Botenstoff und wird durch Adenylatzyklen aus Adenosintriphosphat (ATP) gebildet und durch Phosphodiesterasen in Adenosinmonophosphat (AMP) abgebaut. In der Signaltransduktion sind cAMP verschiedene Enzyme nachgeschaltet, wie die Proteinkinase A (PKA), dem „Exchange Protein activated by cAMP“ (EPAC) sowie cAMP-regulierte Ionenkanäle. Diese wiederum können daraufhin Transkriptionsfaktoren aktivieren, wie zum Beispiel das „cAMP response element-binding protein“ (CREB) oder inaktivieren, wie zum Beispiel NF- κ B (Neumann et al. 1995; Christian et al. 2016; Zaccolo et al. 2021). Durch Zellkompartimentierung können dadurch spezifische und unterschiedliche Prozesse vermittelt werden. Das cAMP ist zum Beispiel an der Aktivierung, Proliferation und Migration von Zellen sowie dem Lipidmetabolismus, dem Glukosemetabolismus und der Homöostase von Mitochondrien beteiligt (Beavo und Brunton 2002; Aslam und Ladilov 2022). Auch im Rahmen von Entzündungsreaktionen ist das cAMP von großer Bedeutung. Bei Stimulation von Mikrogliazellen mit TNF α konnte beobachtet werden, dass die intrazellulären cAMP-Spiegel reduziert wurden und die Aktivität der PDE4 erhöht war (Ghosh et al. 2012). Gleichzeitig konnte in anderen Studien gezeigt werden, dass die Reduktion von cAMP zu einer vermehrten Sekretion von proentzündlichen Zytokinen wie TNF α und MCP-1 und vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen, wie z.B. VCAM-1 und ICAM-1, auf Endothelzellen und Leukozyten führt (Tavares et al. 2020).

1.3.2 Phosphodiesterase-Inhibitoren in der klinischen Anwendung

Phosphodiesterase-Inhibitoren (PDEi) sind in Deutschland ein Bestandteil der Pharmakotherapie verschiedener Erkrankungen. Zugelassen sind jedoch nur PDEi der Isoformen 3,4 und 5.

In der Gruppe der PDE-3-Inhibitoren sind Milrinon und Enoximon (PDE-3 und 4 Inhibitor) zugelassen. Beide werden im Bereich der akuten Dekompensation bzw. Herzinsuffizienz verwendet. Man verwendet sie v.a. aufgrund des inotropen Effektes, bei nicht Ansprechen oder Wirkverlust der Erstlinientherapie (Sander 2018; Schulz et al. 2019).

Die wohl bekannteste Gruppe zugelassener PDEi ist die Gruppe der PDE-5-Inhibitoren. Allen voran steht Sildenafil, welches zunächst im Rahmen von

Herzkreislauferkrankungen erforscht wurde, jedoch als Nebeneffekt positive Effekte im Bereich der erektilen Dysfunktion (ED) vermittelte (Boolell et al. 1996). Dafür erhielt es im Jahr 1998 in den USA und in Deutschland die Zulassung durch die verantwortlichen Zulassungsbehörden (Catania 1998). Wenig später fand Sildenafil auch Anwendung im Bereich von Herzkreislauferkrankungen und wurde 2005 zur Behandlung der pulmonalen Hypertonie zugelassen. Ebenfalls dafür zugelassen ist Tadalafil, ein weiterer PDE5i (Barnes et al. 2019). Sowohl bei der erektilen Dysfunktion, als auch der pulmonalen Hypertonie beruht der Effekt auf einer verstärkten Gefäßdilatation, welches durch die Hemmung des Abbaus von cGMP vermittelt wird. cGMP führt zu einer Aktivierung der Proteinkinase G, welche wiederum zu vermehrten Einstrom von Calcium führt und somit zu einer Relaxation der glatten Muskelzelle (Boolell et al. 1996; Barnes et al. 2019).

In der Gruppe der PDE4i sind in Deutschland Roflumilast und Apremilast zugelassen. Roflumilast ist für die Therapie der chronisch obstruktiven Lungenkrankheit (COPD) zugelassen. In einer großen Metaanalyse der Cochrane Collaboration verglichen Chong und Kollegen 34 Studien, wie Roflumilast sich auf die chronisch, obstruktive Lungenkrankheit (COPD) auswirkt. Dabei konnten sie feststellen, dass die Lungenfunktion verbessert werden konnte, jedoch nicht die Lebensqualität und Symptome (Chong et al. 2017). Naheliegender wurde untersucht, ob Roflumilast günstige Effekte im Krankheitsbild Asthma vermittelt. In einer Metanalyse, anhand von 14 untersuchten Studien, stellte man fest, dass die Lungenfunktion verbessert und Exazerbationsrate verringert wurde. Jedoch waren auch Kopfschmerzen und Übelkeit signifikant erhöht (Luo et al. 2018). Auf zellulärer Ebene ist für Roflumilast beschrieben, dass es in LPS-stimulierten Monozyten die Sekretion proinflammatorischer Zytokine, wie $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ inhibiert. Auch wurde gezeigt, dass Roflumilast die NF- κ B-Aktivität, und Aktivierung der MAPK p38 und JNK 1/2 in LPS-stimulierten Monozyten inhibiert (Kwak et al. 2005). Auf die bereits bekannten Effekte von Apremilast, dem in dieser Arbeit untersuchten Pharmakon, wird im Folgenden eingegangen.

1.3.3 Apremilast (Phosphodiesterase-4-Inhibitor)

Allgemeine Einführung

Apremilast gehört zur Gruppe der Phtalimid-Derivate. Dass Phtalimid-Derivate, wie z.B. Thalidomid die LPS-induzierte $\text{TNF}\alpha$ -Sekretion in PBMCs inhibieren könne, wurde schon 1996 von Muller und Kollegen gezeigt (Muller et al. 1996). Die gleiche Arbeitsgruppe fand wenig später heraus, dass die Hemmung der $\text{TNF}\alpha$ -Sekretion in peripheren Blutmonozyten (PBMC) über die Inhibition der PDE-4 vermittelt wird (Muller et al. 1998).

Im Laufe der Zeit wurden die Derivate chemisch divers modifiziert, um zum einen die Wirksamkeit bzw. Potenz und zum anderen die chemischen Eigenschaften zu verbessern. Im Jahr 2009 veröffentlichte als erste die Arbeitsgruppe um Man und Kollegen eine Arbeit, in der sie von der Synthetisierung von Apremilast berichten. Der chemische Name, nach Regeln der Internationalen Union für Reine und Angewandte Chemie (IUPAC) ist N-{2-[(1S)-1-(3-Ethoxy-4-methoxyphenyl)-2-(methylsulfonyl)ethyl]-2,3-dihydro-1,3-dioxo-1H-isoindol-4yl}acetamid (Man et al. 2009). Die Summenformel von Apremilast lautet $C_{22}H_{24}N_2O_7S$, die Molmasse ist 460,5 g/mol. Die mittlere inhibitorische Konzentration auf die PDE4 liegt bei 74 nM. Es zeigte sich dabei für Apremilast, dass es eine potentere TNF α -inhibitorische Wirkung als andere Derivate, wie Thalidomid oder Roflumilast besitzt. Die mittlere inhibitorische Konzentration bei der LPS-induzierten TNF α -Sekretion in humanen PBMC's liegt für Apremilast bei 0,2 nM und für Roflumilast bei 0,3 nM (Man et al. 2009).

Molekulare Wirkungen

Die Arbeitsgruppe um Schafer und Kollegen sind Vorreiter in der molekularen Untersuchung von Apremilast auf verschiedene Zelltypen. Zunächst einmal zeigten sie, zusammen mit Man und Kollegen, dass Apremilast tatsächlich nur die PDE-4 inhibiert (Man et al. 2009; Schafer et al. 2014). Es konnte dabei keine Präferenz für eine der Subtypen PDE4A1A, PDE4B1, PDE4B2, PDE4C1 und PDE4D2 festgestellt werden (Schafer et al. 2014). Des Weiteren verglichen sie verschiedene PDE-4-Inhibitoren in Bezug auf ihren intrazellulären cAMP-Anstieg in PBMCs. Roflumilast führte konzentrationsabhängig zu einem stärkeren Anstieg von cAMP als Apremilast. Jedoch waren Rolipram und Cilomilast, weniger potent als Apremilast (Schafer et al. 2014). In LPS-stimulierten PBMCs wurde gezeigt, dass Apremilast sowohl die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie TNF α , IFN α , IL-23 und IL-2, als auch Chemokine wie CXCL-9, CCL-2, GM-CSF, IP-10 und CCL-4 hemmt. Interessanterweise konnte die Sekretion von IL-8 und IL-1 β nicht gehemmt werden. Zusätzlich dazu wurde untersucht, ob ein Effekt auf der Genebene verschiedener Zytokine besteht. In LPS-stimulierten PBMCs konnte u.a. die TNF α - und IFN γ -mRNA-Expression inhibiert werden. (Schafer et al. 2010; Schafer et al. 2014). Auch in Anti-CD3-stimulierten T-Lymphozyten führte Apremilast zu einer Reduktion der Sekretion von z.B. CCL-5, IL-2, GM-CSF, TNF α , IL-17, und CCL-2 (Schafer et al. 2014). Anti-CD3 führt zu einer T-Zell-Proliferation- und Aktivierung (Zappasodi et al. 2019). Auf Ebene der Signalwege wurde beobachtet, dass in TNF α -stimulierten Jurkat-Zellen, einer immortalisierten T-Zelllinie, und in LPS-stimulierten monozytären THP-1 Zellen die p65-Translokation in den Zellkern nach 1 Stunde nicht gehemmt wurde. Jedoch führte die Behandlung mit Apremilast nach 6

Stunden zu einer verringerten NF- κ B Aktivität in beiden Zelllinien (Schafer et al. 2014). Die Wirkung auf Endothelzellen ist nur in einem Paper von Wang und Kollegen (2020) beschrieben, welches während der Anfertigung dieser Arbeit veröffentlicht wurde. Sie nutzten humane aortale Endothelzellen (HAECs) und stimulierten sie mittels oxLDL. Dabei fanden sie heraus, dass Apremilast den durch oxLDL hochregulierten, endothelialen Rezeptor LOX-1 (lectin like ox LDL recepter) in seiner Gesamtexpression inhibieren konnte. Dieser Rezeptor vermittelt v.a. die oxLDL induzierte endotheliale Aktivierung im Bereich der Atherosklerose. Sie zeigten, dass mittels Apremilast sowohl die IL-6-, IL-8- und TNF α -Sekretion, als auch die mRNA-Expression dieser Zytokine reduziert wurde. Des Weiteren konnte mittels Apremilast, die MCP-1 Sekretion und VCAM-1 Expression vermindert werden. Beide spielen in der Leukozyten-Endothelzellinteraktion während der beginnenden Atherosklerose eine wichtige Rolle. Passend dazu, konnte Apremilast die oxLDL-induzierte Adhäsion von U937-Monozyten an eine Endothelzellschicht aus HUVEC inhibieren. Auf Details und Vergleiche wird in der Diskussion eingegangen (Wang et al. 2020).

Diese bisherigen Ergebnisse schreiben Apremilast *in vitro* deutliche anti-entzündliche Effekte zu, v.a. auf Zellen die in der Pathogenese der Psoriasis vulgaris eine wichtige Rolle spielen.

1.3.3.1 Zulassung in Deutschland für die Psoriasis vulgaris

Im Zuge der bereits beschriebenen Entdeckung wurde die erste Pilotstudie von Apremilast am Menschen mit Psoriasis vulgaris (PV) durchgeführt. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Verdickung der Epidermis in psoriatischen Läsionen reduziert wurde und weniger T-Lymphozyten in der Epidermis und Dermis vorzufinden sind (Gottlieb et al. 2008). Es folgten weitere Zulassungsstudien, zur Wirksamkeit von Apremilast an Patienten mit PV und Psoriasis-Arthritis. Diese wurden, wie für andere Medikamente randomisiert, doppelblind und placebokontrolliert durchgeführt. In der Phase-IIb-Zulassungsstudie von Papp und Kollegen wurde gezeigt, dass Apremilast in den Dosen 20-30 mg, zwei Mal täglich eingenommen, zu einer signifikanten Verbesserung der Plaque-Psoriasis führte. In der Dosierung 20 mg erreichten 29% eine PASI-75-Reduktion, und bei 30 mg 41%. 5% der Patienten berichteten über Nebenwirkungen wie Kopfschmerzen, Übelkeit, Diarrhö und Gastroenteritiden (Papp et al. 2012). Auch die Phase-III-Studien, ESTEEM 1 und 2, konnten Apremilast bei einer mittleren bis schweren Plaque-Psoriasis gute Resultate im Vergleich zur Placebogruppen zuschreiben. Eingeschlossen wurden dafür Patienten, welche einen Psoriasis-Area-and Severity-Index (PASI) >12 besaßen und bei denen mehr als 10%

der Körperoberfläche betroffen war. In den ersten 16 Wochen waren die Studien gleich konzipiert, so erhielten ca. 33% der Patienten ein Placebo, und ca. 66% 30 mg Apremilast zwei Mal täglich. Beispielsweise wurde in ESTEEM 1 gezeigt, dass 33,1 % der Patienten, welche über 16 Wochen zweimal täglich 30 mg zu sich nahmen, eine PASI-75-Reduktion erreichen. In der Placebogruppe wurde dies nur in 5,3 % der Fälle erreicht. In ESTEEM 2 waren es 28,8 % mit einer PASI-75-Reduktion. Die 16 Wochen waren der entscheidende Endpunkt für die Zulassung. (Papp et al. 2015; Paul et al. 2015). Aufgrund der belegten Wirksamkeit in den verschiedenen Studien und der Risiko-Nutzen-Bewertung wurde Apremilast am 15.01.2015 durch die Europeans Medicine Agency in der Europäischen Union zugelassen (EMA 2015).

1.3.3.2 Aktuelle Studienlage im Bereich des Metabolischen Syndroms

Die Gruppe um Crowley und Kollegen führte die ESTEEM 1 und 2 Studien bis zur Woche 156 fort, um die Langzeitauswirkungen von Apremilast zu analysieren. Sie untersuchten dabei neben der Wirksamkeit und den Nebenwirkungen außerdem den BMI der Patienten. Dabei stellten sie fest, dass nach 156 Wochen unter Apremilast, zwei Mal täglich 30 mg, vor allem die Patienten mit einem höheren BMI ihr Gewicht reduzieren konnten. Die Gruppen wurden wie folgt unterteilt: $<25 \text{ kg/m}^2$, $25\text{-}30 \text{ kg/m}^2$ und $>30 \text{ kg/m}^2$. 13,4% der Patienten mit einem BMI $<25 \text{ kg/m}^2$ konnten nach 156 Wochen 5% ihres Gewichtes reduzieren. In der Gruppe $25\text{-}30 \text{ kg/m}^2$ waren es 22,1 % und in der Gruppe von einem BMI >30 waren es sogar 24,7% die eine 5%ige Gewichtsreduktion erreichten (Crowley et al. 2017). Der positive Effekt auf den BMI konnte in einer weiteren, größeren Studie mit 60 Psoriasis-Arthritis-Patienten nachgewiesen werden (Ferguson et al. 2022). In einer Fallveröffentlichung von Gualtierotti und Kollegen konnte eine weitere interessante Beobachtung gemacht werden. Ein 45-jähriger Patient, welcher über 20 Jahre eine Psoriasis-Arthritis litt, wurde in der Vorgeschichte mit Methotrexat und Ciclosporin A behandelt. Aufgrund von Nebenwirkungen und Wirkverlust wurde das Ciclosporin A abgesetzt und die Methotrexatdosis verringert. Daraufhin wurde bei dem Patienten eine Therapie mit Apremilast (30 mg/2xtäglich) eingeleitet. Vor Beginn der Therapie untersuchte man die Serumfettwerte und stellte dabei fest, dass er erhöhte Triglyceride (173 mg/dl), LDL-Werte (115 mg/dl) und erniedrigte HDL-Werte (35 mg/dl) aufwies. Es erfolgten mehrere Follow-Up Untersuchungen und man konnte feststellen, dass nach 12 Monaten die TG auf 146 mg/dl, LDL auf 85,4 mg/dl gesunken und der HDL-Werte auf 42 mg/dl gestiegen war, ohne das zusätzliche diätetische und körperliche Maßnahmen eingeleitet wurden. Ebenfalls konnte eine Reduktion des BMI um 5% beobachtet werden. Der Patient hatte bereits bei Beginn ein normwertigen BMI von $21,5 \text{ kg/m}^2$ (Gualtierotti und Lucia 2019). In einer einarmigen, nicht randomisierten

Interventionsstudie von Gelfand und Kollegen konnte durch die Gabe von Apremilast 30 mg zwei Mal täglich das subkutane und abdominale Fettgewebe um 5-6% reduziert werden. Weiterhin wurde eine Reduktion einiger kardiometabolischer Biomarker, wie z.B. Ketonkörper, Interleukin-1 β oder β -Hydroxybutyrat gemessen. Es zeigte sich keine Änderung der vaskulären Entzündung der Aorta, welche mittels FDG-PET/CT gemessen wurde. wurde die vaskuläre Entzündungsaktivität in der Aorta mittels PET-CT gemessen, hier zeigte sich allerdings kein signifikanter Unterschied (Gelfand et al. 2022). Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass Apremilast möglicherweise eine Auswirkung auf die bekannten Risikofaktoren der Psoriasis, des metabolischen Syndrom und der Atherosklerose besitzen könnte.

1.4 Hypothese und Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit ist es, den Einfluss von Apremilast, einem zur Therapie der Psoriasis vulgaris (PV) zugelassenen Medikament, auf entzündlich aktivierte Endothelzellen zu untersuchen. Es ist mittlerweile bekannt, dass die PV nicht nur eine Erkrankung der Haut, sondern eine systemische Erkrankung ist. Zahlreiche Studien, zeigen eine Assoziation zwischen der PV und der Atherosklerose sowie dem Symptomkomplex des metabolischen Syndroms. Die Atherosklerose führt zur chronisch koronaren Herzkrankheit, welche die häufigste Todesursache in Deutschland und global ist. Risikofaktoren zur Entwicklung einer Atherosklerose und PV sind ähnlich, dazu gehören beispielsweise ein erhöhter BMI, erhöhte (LDL und Triglyceride) und erniedrigte (HDL) Serumfette, Insulinresistenz, Nikotinkonsum und körperliche Inaktivität. Für Apremilast konnte in Studien bereits ein positiver Effekt auf den BMI und Serumfette gezeigt werden. Da die Initiierung der Atherosklerose an der innersten Schicht der Gefäße, den Endothelzellen beginnt, stellte sich die Frage, ob Apremilast dort artheroprotektive Einflüsse vermittelt. Am Anfang steht die Aktivierung des Endothels, was unter anderem durch oxLDL, TNF α und IL-17 vermittelt wird. TNF α und IL-17 sind ebenfalls maßgeblich an der Pathogenese der PV beteiligt, zirkulieren im Blut, und treten in Kontakt mit Endothelzellen. Durch die Aktivierung der Endothelzellen mit diesen Stimulantien kommt es zur Sekretion verschiedener Zytokine, welche zum einen chemotaktisch Eigenschaften auf Leukozyten vermitteln (z.B. MCP-1, IP-10) und zum anderen die Differenzierung von Zellen des Immunsystems fördern (z.B. GM-CSF). Zusätzlich werden verschiedene Adhäsionsrezeptoren hochreguliert, welche an der Adhäsion (z.B. E-Selektin, VCAM-1, ICAM-1) und folgend der Transmigration (z.B. PECAM-1, JAM-A) von Leukozyten durch die Endothelzellschicht beteiligt sind. An der Regulierung dieser proatherogenen Prozesse sind verschiedene Signalwege, wie der MAPK-Signalweg, und Transkriptionsfaktoren, wie NF- κ B beteiligt. Dass Apremilast eine atheroprotektive Wirkung auf einige der genannten Faktoren in oxLDL-stimulierten Endothelzellen vermittelt, wurde bereits teilweise untersucht. Welche Effekte es jedoch auf TNF α -stimulierte Endothelzellen vermittelt, einem Hauptmediator der PV, ist unbekannt. Zusammenfassend sollen die durchgeführten Untersuchungen dazu beitragen, neue Erkenntnisse über den Einfluss von Apremilast auf vaskuläre Inflammation zu gewinnen, um neue Therapiestrategien bei der Behandlung verschiedener chronisch-entzündlicher Erkrankungen, die mit einem erhöhten Risiko für kardio-vaskuläre Erkrankungen einhergehen, zu entwickeln.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Allgemeine Reagenzien und Substanzen

Name	Firma, Sitz
Acrylamid/Bisacrylamid (5:1)	AppliChem, Darmstadt
Bovines Serumalbumin, Fraktion V	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe
Aqua ad injectabilia	Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
BCECF, AM	Invitrogen, Carlsbad, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
EDTA	Roche, Basel, Schweiz
Ethanol, 70 %	SV Liquid Productions, Flintsbach
Ethanol absolut	Otto Fischar, Saarbrücken
Glycerol	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe
Immobilon Forte, Western HRP Substrate	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Laemmli Sample Buffer (4x)	BioRad, München
Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($MgCl_2 \cdot 6 H_2O$)	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumazid (NaN_3)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Carl Roth, Karlsruhe
NP-40	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
PBS-Pulver	AppliChem, Darmstadt
PCR-grade water	Biotech Rabbit, Henningsdorf

Protease/Phosphatase Inhibitor (1000x)	Cell Signaling, Danvers, USA
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Merck, Darmstadt
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
TRIS	Carl Roth, Karlsruhe
TRIS-Hydrochlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Tween-20	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Triton-X 100	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Trypan-Blau	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA
Ziegenserum	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA

2.1.2 Geräte

Name	Typ	Firma, Firmensitz
90°C Erhitzer	LCx Dry Bath	Abbott, Hannover
Absauger	Vacusaft Comfort	Integra, Hudson, USA
Analysewaage	SI-235 (Max: 230g; d=0,01mg)	Denver Instrument, Denver USA
Fluoreszenzmikroskop	Axio Scan.Z1	Zeiss, Oberkochen
Chemilumineszenzgerät	ChemoStar ECL & Fluorescence Imager	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Brutschrank	Heracell 150i	Thermo Fisher, Waltham, USA
ELISA-Reader	Tecan Infinite M200	Tecan, Männedorf, Schweiz
FACS-Gerät	BD FACSCanto II	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
Gelelektrophoresekammer (Wester-Blot)	Mini-ProteanTetra Cell	Bio Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Kühlschrank -80°C	Ultra Low Temp. Freezer	New Brunswick Scientific, New Jersey, USA
Mikroskop (Zellkultur)	DM IL LED	Leica, Wetzlar
Thermozykler (PCR)	Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	766 Calimatic	Knick, Berlin

Pipette (0,5-10 µl)	Research pro	Eppendorf, Hamburg
Pipette (10-100 µl)	Research pro	Eppendorf, Hamburg
Pipette (100-1000 µl)	Research pro	Eppendorf, Hamburg
Mehrkanalpipette (20-200 µl)	Discovery Comfort	HTL, Warschau, Polen
Pipettierhilfe (Zellkultur)	Pipetboy 2	Integra, Hudson, USA
Pipettierhilfe (Labor)	Pipetus	Hirschmann, Eberstadt
Kapilläre Gelelektrophorese	Qiaxcel Advanced	Qiagen, Venlo, Niederlande
Stickstofftank		Cryo Tec, Geilnau
Stromaggregat	Power Pac 200	Bio Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Transferkammer (Western-Blot)	Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell	Bio Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Wasserbad	TW12	Julabo, Seelbach
Wippe	Polymax 1040	Heidolph Instruments, Schwabach
Neubauerzählkammer	0,1 mm Tiefe; 0,0025 mm² Fläche	Laboroptik, Lancing, UK
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Zentrifuge (Zellkultur)	Megafuge 40R	Thermo Fisher, Waltham, USA
Zentrifuge (FACS-Platz)	Megafuge 16R	Thermo Fisher, Waltham, USA
Zentrifuge (4°C)	5417 R	Eppendorf, Hamburg
Zellkulturbank	HERA Safe KS	Thermo Fisher, Waltham, USA

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Name	Typ	Firma, Sitz
12 Lochplatte (steril)	Cell Culture Plate, with lid	Greiner Bio-One, Kremsmünster
6 Lochplatte (steril)	Cell Culture Plate, with lid	Greiner Bio-One, Kremsmünster
96 Lochplatte flach (steril)	Cell Culture Plate, with lid	Greiner Bio-One, Kremsmünster
96 Lochplatte rund (unsteril)	MICROPLATTE, U-BODEN, TRANSP	Greiner Bio-One, Kremsmünster

Löschpapier	Rotilabo®- Blottingpapiere, Dicke 0,35 mm	Carl Roth, Karlsruhe
Deckgläser	rund, D=12 mm	Karl Hecht, Sondheim
Kryoröhrchen	CRYO.S	Greiner Bio-One, Kremsmünster
PVDF-Membran	Immobilon-FL PVDF, 0,45 µm	Merck, Darmstadt
Reaktionsgefäß (1,5 ml)	SafeSeal	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäß (2 ml)	SafeSeal	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäß (5 ml)	SafeSeal	Eppendorf, Hamburg
Schraub Röhrchen	Mirko-Schraubrohre 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipette 5 ml	CELLSTAR®	Greiner Bio-One, Kremsmünster
Serologische Pipette 10 ml	CELLSTAR®	Greiner Bio-One, Kremsmünster
Serologische Pipette 25 ml	CELLSTAR®	Greiner Bio-One, Kremsmünster
Transwelleinsätze (8 µM Porendurchmesser)	Transwell® polycarbonate membrane cell culture inserts	Corning, Corning, USA
T75/175-Zellkulturfalsche	Nunc EasYFlask 175/75 cm ²	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
T75 (THP-1)	Cell Culture Flasks, 250 ml, red standard cap	Greiner Bio-One, Kremsmünster
Zellkulturschale	60,1 und 22,1 cm ²	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellschaber	Cell Scraper 2-Position Blade 25	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml)	CELLSTAR®	Greiner Bio-One, Kremsmünster

2.1.4 Zellen

2.1.4.1 Primäre humane Endothelzelllinie: HUVEC

HUVEC (dt. Humane Umbilikalvenenendothelzellen, engl. human umbilical vein endothelial cells) sind primäre Endothelzellen, die aus Nabelschnurvenen des Menschen frisch gewonnen werden (Baudin et al. 2007). Auf dem Gebiet der vaskulären Biologie gehören sie aufgrund der einfachen Gewinnung und der weitgehenden Erhaltung ihrer endothelialen Eigenschaften zu den wichtigsten primären Zelllinien (Park et al. 2006). Die für diese Untersuchungen verwendeten HUVEC wurden käuflich bei Promo Cell (Heidelberg) erworben. Nach Expansion, wurden verschiedene Passagen im Stickstofftank bei -180°C eingefroren, und bei Bedarf aufgetaut. Für die durchgeführten Experimente wurden die Zellen bis zur Passage 6 verwendet.

Medium HUVEC

Für die Zellkultur und die Versuche verwendeten wir das Endothelial Cell Growth Medium Kit von Promo Cell (Heidelberg). Es besteht aus dem Endothelzellbasalmedium (engl. Endothelial Cell Basal Medium) und folgenden Supplementen: Humaner epidermaler Wachstumsfaktor (0,1 ng/ml), humaner Fibroblastenwachstumsfaktor (1 ng/ml), endotheliales Zellwachstumssupplement (0,004 ml/ml), Hydrokortison (1 µg/ml) und Heparin (90 µg/ml). Zusätzlich wurden Gentamicin-Amphotericin als Antibiotikum (1:1000) und fetales Kälberserum (FKS) als Serumzusatz (untersch. Konzentrationen) hinzugefügt.

2.1.4.2 Humane Monozytenzelllinie: THP-1

THP-1 (Tohoku Hospital Pediatrics-1) sind eine immortale Monozyten-Zelllinie, die 1980 aus einem jungen Patienten mit akuter monozytärer Leukämie gewonnen wurden, und seitdem vervielfältigt worden (Tsuchiya et al. 1980). Im Bereich der Forschung sind sie ein oft genutztes Modell, um die Eigenschaften und Funktionen von Monozyten zu untersuchen. Dabei geht es vor allem um die Interaktion mit Endothelzellen, Thrombozyten und T-Zellen (Qin 2012).

Medium THP-1

Für die Zellkultur und die Versuche verwendeten wir das Medium RPMI-1640 (Invitrogen). RPMI steht für „Roswell Park Memorial Institute“, wo es das erste Mal entwickelt und beschrieben wurde, und die Zahl 1640 im Sinne der Nummerierung auf die bis dahin entwickelten Medien (Moore 1967). Hinzugefügt wurden L-Glutamin

(1:100), Penicillin-Streptomycin (1:100), β -Mercaptoethanol (1:1000) und fetales Kälberserum 10% (FKS 10%).

2.1.4.3 Substanzen und Reagenzien in der Zellkultur

Name	Firma, Sitz
Apremilast	Axon Medchem, Groningen
2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(and-6)-Carboxyfluorescein, Acetoxymethyl Ester (BCECF, AM)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
TNF α	Relia-Tech, Wolfenbüttel
DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Endothelial Cell Growth Medium Kit	PromoCell, Heidelberg
Fetales Kälberserum (für HUVEC)	PromoCell, Heidelberg
Fetales Kälberserum (für THP-1) (hitzeinaktiviert)	BioChrom, Cambridge, UK
Fetales Kälberserum (Transmigration) (nicht hitzeinaktiviert)	BioChrom, Cambridge, UK
Flash Phalloidin™ Green 488	BioLegend, San Diego, USA
Gelatine (Schwein)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Gentamicin-Amphotericin	Lonza, Basel, Schweiz
L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Penicillin-Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PBS (ohne Magnesium/Kalzium)	PAN-Biotech, Aidenbach
ProLong™ Gold and Diamond Antifade Mountants	Invitrogen, Carlsbad, USA
Resveratrol	Sigma-Aldrich, Hamburg
Roflumilast	Selleckchem, Houston, USA

RPMI1640 Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
SB203580 (p38-Inhibitor)	Invivogen, San Diego, USA
SP600125 (JNK1/2-Inhibitor)	Invivogen, San Diego, USA
Triton™X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin/EDTA (0,04% / 0,03%)	Promo Cell, Heidelberg
U0126 (MEK1/2-Inhibitor)	Invivogen, San Diego, USA

2.1.5 Antikörper Westernblot

2.1.5.1 Primäre Antikörper

Name	Charakteristik	Verwendung	Quelle	Hersteller
GAPDH	monoklonal	Western-Blot	Maus	Santa Cruz, Heidelberg
JNK 1/2	polyklonal	Western-Blot	Kaninchen	Cell Signaling, Danvers, USA
Phospho-JNK 1/2 (Thr183/Tyr185)	polyklonal	Western-Blot	Kaninchen	Cell Signaling, Danvers, USA
ERK 1/2	polyklonal	Western-Blot	Kaninchen	Cell Signaling, Danvers, USA
Phospho-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204)	polyklonal	Western-Blot	Kaninchen	Cell Signaling, Danvers, USA
p38	polyklonal	Western-Blot	Kaninchen	Cell Signaling, Danvers, USA
Phospho-p38 (Thr180/Tyr182)	polyklonal	Western-Blot	Kaninchen	Cell Signaling, Danvers, USA
p65	polyklonal	Western-Blot/ Immunfluoreszenz	Kaninchen	Cell Signaling, Danvers, USA
Phospho- p65 (Ser536)	polyklonal	Western-Blot	Kaninchen	Cell Signaling, Danvers, USA
IκBα	monoklonal	Western-Blot	Maus	Santa Cruz, Heidelberg
PARP	polyklonal	Western-Blot	Kaninchen	Cell Signaling, Danvers, USA
VCAM-1	polyklonal	Western-Blot	Kaninchen	Cell Signaling, Danvers, USA
ICAM-1	monoklonal	Western-Blot	Maus	Santa Cruz, Heidelberg

E-Selektin	monoklonal	Western-Blot	Maus	Santa Cruz, Heidelberg
JAM-A	monoklonal	Western-Blot	Maus	Santa Cruz, Heidelberg
PECAM-1	monoklonal	Western-Blot	Maus	Cell Signaling, Danvers, USA

2.1.5.2 Sekundäre Antikörper

Name	Charakteristik	Spezies	Konjugat	Hersteller
Anti-Kaninchen IgG	polyklonal	Ziege	HRP	Dako, Glostrup, Denmark
Anti-Maus IgG	polyklonal	Ziege	HRP	Dako, Glostrup, Denmark
Anti-Ratte IgG	polyklonal	Ziege	Alexa Fluor® 555	Invitrogen, Carlsbad, USA

2.1.6 Primer für die RT-PCR

Alle Primer wurden von der Firma Eurofins Genomics (Luxemburg, Luxemburg) synthetisiert. Nach der Literaturrecherche wurden die Primer für humanes GM-CSF (Newton et al. 2010) und humanes β -Aktin (Hrgovic et al. 2016), im digitalen Primer-Tool von PubMed „Primer-BLAST“ (National Center for Biotechnology Information (NCBI) [1988] – [zitiert 2024]) auf Vollständigkeit, Fragmentlänge und Schmelztemperaturen überprüft.

Name	Genbank-ID	Sequenz (5' → 3')	Fragmentlänge
Humanes GM-CSF	M11220.1	For.: ATGTTTGACCTCCAGGAGCCGA Rev.: CTGGCTCCCAGCAGTCAAAGGG	238 bp
Humanes β -Aktin	NM_001101.5	For.: TCCTGTGGCATCCACGAAACT Rev.: GAAGCATTTGCGGTGGACGAT	315 bp

2.1.7 Gebrauchsfertige Analyse-Kits

Name	Firma, Sitz
CytoSelect™ Leukocyte-Endothelium Adhesion Assay	Cell Biolabs Inc., San Diego, USA

Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche, Basel, Schweiz
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche, Basel, Schweiz
DC protein assay	BioRad, München
Human GM-CSF ELISA MAX™ Standard Set	BioLegend, San Diego, USA
Human IL-8 ELISA MAX™ Standard Set	BioLegend, San Diego, USA
Human IP-10 ELISA MAX™ Deluxe Sets	BioLegend, San Diego, USA
Human MCP-1 ELISA MAX™ Deluxe Sets	BioLegend, San Diego, USA
peqGOLD Total RNA Kit	VWR, Radnor, USA
peqGOLD DNase I Digest Kit	VWR, Radnor, USA
One Step RT-PCR Kit	Biotech Rabbit, Henningsdorf
Qiaxcel DNA Fast Analysis Kit (3000)	Qiagen, Venlo, Niederlande
RayBio® Human Cytokine Antibody Array 5	RayBiotech, Norcross, USA

2.1.8 Weitere Materialien

Name	Firma, Firmensitz
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.9 Software

Name	Version	Firma, Firmensitz
Magelan	6.6	Tecan, Männedorf, Schweiz
FlowJo	10.6.2	BD Biosciences, San Jose, Kalifornien, USA
ImageJ	1.52a	National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA
ZEN Microscope Software	3.0.79.0000	Zeiss, Oberkochen
BD FACSDiva Software	6.1.3	BD Biosciences, San Jose, Kalifornien, USA
QIAxcel Screen Gel Software	1.6.0.10	Qiagen, Venlo, Niederlande
Prism5 for Windows	5.01	GraphPad Software, Inc.

2.2 Methodik

2.2.1 Zellkultur HUVEC

Die HUVEC wurden zuerst expandiert und danach verschiedene Passagen im Stickstofftank bei -180°C eingefroren, siehe weitere Kapitel. Bei allen Zellkulturexperimenten sowie dem Passagieren wurden die Zellen täglich im Mikroskop auf Konfluenz, Morphologie und Vitalität überprüft.

2.2.1.1 Auftauen und Kultivierung der Zellen

Zum Starten der Zellkultur wurde ein Kryoröhrchen mit den benötigten HUVEC aus dem Stickstofftank geholt, und für 2 Minuten im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Direkt danach wurden die Zellen mit dem frischen Medium (+ 5% FKS) vermischt und für 10 Minuten bei 200 g zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde die Zellkulturflasche (75 cm^2 oder 175 cm^2) mit 0,1% Gelatine in PBS für 10 Minuten beschichtet. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 5 ml frischem Medium (+ 5% FKS) resuspendiert. Die Gelatine wurde abgesaugt, und die Zellsuspension in die Flasche gegeben. Bei einer 75 cm^2 -Zellkulturflasche wurde auf 15 ml, und bei einer 175 cm^2 -Zellkulturflasche auf 25 ml Gesamtvolumen an Medium (+ 5% FKS) aufgefüllt. Daraufhin erfolgte die Kultivierung im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 . Nach zwei Tagen wurde das Medium abgesaugt und durch frisches ersetzt. Eine Konfluenz von ca. 85% war nach ca. 3-4 Tagen erreicht.

2.2.1.2 Ernte und Passagieren

Nach Erreichen von einer Konfluenz von ca. 85 % wurden die Zellkulturflaschen aus dem Brutschrank genommen und zwei Mal mit PBS (ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) gewaschen. Danach wurden 2 ml (75 cm^2) bzw. 4 ml (175 cm^2) Trypsin/EDTA (0,04% / 0,03%) hinzugefügt um die Zellen vom Untergrund abzulösen. Der Ablösevorgang wurde mikroskopisch verfolgt und gegebenenfalls durch leichtes Klopfen an der Flaschenwand erleichtert. Nach ca. 5-8 Minuten waren alle Zellen vom Flaschenboden gelöst, und die enzymatische Reaktion mit 8 ml (75 cm^2) bzw. 6 ml (175 cm^2) Medium (+5% FKS) abgestoppt. Die Suspension wurde aufgenommen und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Im Anschluss kamen die Zellen für 10 min bei 200 g in die Zentrifuge. Der Überstand wurde abgesaugt und die HUVEC in 5 ml Medium (+5% FKS) resuspendiert. Danach wurden die Zellen gezählt (Kap. 2.2.1.3) und entweder weiter passagiert, eingefroren (Kap. 2.2.1.4) oder für verschiedene Experimente ausgesät.

2.2.1.3 Zellzählung

Ein Teil der resuspendierten Zellen wurde im Verhältnis 1:2 (Zellkulturfalsche 75 cm²) bzw. 1:5 (Zellkulturfalsche 175 cm²) mit Trypan-Blau vermischt, und davon 10 µl auf die Neubauerzählkammer gegeben. Für die verwendete Neubauerzählkammer wird standardmäßig das unten angegebene Volumen, welches sich aus einer festgelegten Fläche und Höhe zusammensetzt, verwendet. Die vier Eckquadrate wurden ausgezählt und mit folgender Formel die Zellzahl / ml bzw. µl bestimmt:

$$\frac{\text{Zellzahl in allen Eckquadraten} * \text{Verdünnung}}{\text{Anzahl der Eckquadrate} * \text{Fläche} * \text{Höhe}} = \text{Zellzahl}/\mu\text{l}$$

Fläche * Höhe bei verwendeter Neubauerzählkammer = 0,1 µl

Anzahl der Eckquadrate = 4

Verdünnung = 2 bzw. 5

$$\frac{\text{Zellzahl in allen Eckquadraten} * 2 \text{ bzw. } 5}{0,4 \mu\text{l}} = \text{Zellzahl}/\mu\text{l}$$

2.2.1.4 Einfrieren der Zellen

Das Zellpellet wurde nach dem Ernten in 6 ml Einfriermedium resuspendiert. Dieses besteht aus 50% Medium, 40% FKS und 10% DMSO. Dies wurde zu je 1 ml in Kryoröhrchen gegeben. Die Kryoröhrchen kamen in eine CoolCell, welche im Gefrierschrank bei -80°C für 4 Stunden gelagert wurde. Die CoolCell verhindert ein zu schnelles Gefrieren, und sorgt dafür, dass die Temperatur um ca. 1°C pro Minute gesenkt wird. Beim Auftauen ließ sich dann mittels 1 ml der eingefrorenen Zellen eine neue 175 cm²-Zellkulturflasche ziehen, und zwei der 75 cm²-Zellkulturflaschen.

2.2.1.5 Gewinnung von Zellkulturüberständen

Nach der Zellernte wurden 2*10⁵ HUVEC in 2 ml Medium (+ 5% FKS) in einer 6-Lochplatte ausgesät und im Brutschrank inkubiert. Nach ca. 24 Stunden war eine 85%ige Konfluenz erreicht. Das Medium wurde abgesaugt und frisches Medium (+ 5% FKS) mit den Behandlungssubstanzen hinzugegeben. Die Platten kamen nun wiederum für die angegebene Behandlungsdauer (3, 6, 9, 10, 24 Stunden) in den Brutschrank. Nach den entsprechenden Behandlungszeiten wurden die Überstände entnommen, für

2 Minuten bei 200 g zentrifugiert und die zellfreien Überstände dann in Schraubröhrchen bei -80 °C gelagert.

2.2.1.6 Proteingewinnung

Hier wird die allgemeine Vorgehensweise bis zur Proteinextraktion beschrieben. Zu Beginn wurden $6 \cdot 10^5$ HUVEC in 7 ml Medium (5% FKS) in einer Zellkulturschale (60,1 cm²) ausgesät. Die Schalen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ für ca. 48 Stunden inkubiert. Jeden Tag wurde die Konfluenz unter dem Mikroskop beurteilt. Nach Erreichen einer 80%igen Konfluenz, wurde das alte Medium abgesaugt, und das Medium mit den Behandlungssubstanzen dazugegeben. Die Zellen wurden danach im für den gewünschten Zeitraum inkubiert. Nach der gewünschten Inkubationsdauer wurde das Medium abgesaugt, und die Zellen zwei Mal mit kaltem PBS (+Ca²⁺/Mg²⁺) gewaschen.

2.2.1.6.1 Gesamtprotein

Nach dem Waschen wurden 180 µl Lysepuffer (Zusammensetzung siehe unten) hinzugegeben und die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers von den Kulturschalen gelöst. Die Suspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellreste für 5 Minuten bei 20.000 g abzentrifugiert, der Überstand mit den Proteinen entnommen und diese bei -80°C gelagert. Dem Lyse-Puffer wurde kurz vor Anwendung eine Phosphatase/Protease-Inhibitormixtur hinzugefügt (1:1000). Der Lyse-Puffer besteht aus 20 mM HEPES (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,2% Triton X-100, 10% Glycerin in Aqua ad injectabilia

2.2.1.6.2 Zytosolische und nukleäre Proteine

Nach dem Waschen wurden 500 µl PBS (-Ca²⁺/Mg²⁺) hinzugegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vorsichtig vom Flaschenboden abgelöst. Die Suspension kam in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß und wurde dann für 5 Minuten bei 200 g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in dem zytosolischen Extraktionspuffer (mit NP-40) (s.u.) resuspendiert und dann für 3 Minuten auf Eis inkubiert. Hierbei wird die Zellmembran aufgelöst, der Zellkern bleibt aber noch verschlossen. Danach wurde für 4 Minuten bei 800 g und 4°C zentrifugiert. Die zytoplasmatischen Proteine befanden sich nun im Überstand und wurden in ein Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellkerne mit den nukleären Proteinen befinden sich im Zellpellet. Dieses wurden mittels dem zytosolischen Puffer (ohne NP-40) resuspendiert, gewaschen und für 4 Minuten bei 800 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Pellets im nukleären Extraktionspuffer (s.u.) resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Den Extraktionspuffern wurde kurz vor Anwendung eine Phosphatase/Protease-Inhibitormixtur hinzugefügt (1:1000). Alle 10 Minuten wurde die Resuspension wiederholt, um die letzten Zellkernmembranen aufzulösen. Die zytosolischen und nukleären Proteine wurden nach der Inkubation auf Eis für 12 Minuten bei 20.000 g und 4°C zentrifugiert. Die Überstände mit den Proteinen wurden entnommen, und nach der Proteinbestimmung im Gefrierschrank bei - 80°C gelagert.

Zytosolischer Extraktionspuffer	Nukleärer Extraktionspuffer
<ul style="list-style-type: none">- 10 mM HEPES, pH 7,5- 60 mM KCl- 1 mM EDTA- +/- 10% NP-40- in Aqua ad injectabilia	<ul style="list-style-type: none">- 10 mM HEPES, pH 7,5- 60 mM NaCl- 1 mM MgCl₂- 0,2 mM EDTA- 10 % Glycerol- in Aqua ad injectabilia

Tab. 2.1 Zusammensetzung zytosolischer und nukleärer Protein-Extraktionspuffer

2.2.1.6.3 Proteinbestimmung nach Lowry

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration in einer Probe gibt es verschiedene Methoden. Für die durchgeführten Experimente wurde das DC Protein Assay (BioRad), welches auf der Methode nach Lowry basiert verwendet. Die Methode nach Lowry ist eine seit vielen Jahren anerkannte Methode (Lowry et al. 1951), und deren Beschreibung gleichzeitig der am häufigsten zitierte Artikel weltweit (van Noorden et al. 2014). Sie leitet sich von der klassischen Biuret-Methode ab, kann aber deutlich niedrigere Proteinkonzentrationen detektieren (Lottspeich und Engels 2009). Im ersten

Schritt gehen die Peptidverbindungen des Proteins (v.a. Tyrosin und Tryptophan) im alkalischen Milieu eine Bindung mit den Cu^{2+} -Ionen des Kupfertartats ein. Dieser Cu^{2+} -Komplex wird als Biuretkomplex bezeichnet. Im nächsten Schritt wird das Folin-Ciocalteu-Reagenz hinzugegeben, welches sechswertiges Molybdat enthält. Dieses wird durch den Cu^{2+} -Komplex zu vierwertigem Molybdän reduziert. Es entsteht nun ein Farbumschlag von gelb nach blau, der bei 650 nm Absorption im ELISA-Reader detektiert werden kann. Als Standard dient eine mitgeführte bovine Serumalbumin (BSA)-Standardkurve, über die die Proteinkonzentration proportional zur Farbintensität errechnet werden kann. Alle Experimente wurden in Duplikaten durchgeführt. Es wurde sich stets an die Angaben des Herstellers gehalten.

2.2.1.7 RNA-Isolierung

Am ersten Tag wurden $4,5 \cdot 10^5$ Zellen in 3 ml Medium (+ 5% FKS) in einer Zellkulturschale (22 cm^2) ausgesät und daraufhin im Brutschrank für ca. 24 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Nach Erreichen einer 80%igen Konfluenz, wurde das alte Medium abgesaugt, und frisches Medium (+ 5% FKS) mit den Behandlungssubstanzen dazugegeben. Die Zellen wurden wiederum im Brutschrank mit den Behandlungssubstanzen für den gewünschten Zeitraum inkubiert. Nach der gewünschten Inkubationsdauer wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zwei Mal mit kaltem PBS ($+\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) gewaschen. Für die RNA-Ernte wurde das „Total RNA Kit“ und das „DNase I Digest Kit“ von peqGOLD verwendet, dessen Vorgehen im Folgenden erläutert wird. Die Namen der Reaktionsgefäße und anderer Inhalte sind in der Schreibweise wie in der Anleitung aufgeführt und mit Anführungsstrichen gekennzeichnet. Als erstes wurden die Zellen für 1 Minute mit 400 μl des Lysis-Puffer T inkubiert, welcher gleichmäßig verteilt wurde. Danach wurden die lysierten Zellen mittels eines Zellschabers in der Schale gesammelt, und mittels RNase-freien Pipettenspitzen auf die „DNA Removing Columns“, welche auf einem Sammel-Reaktionsgefäß steckten, aufgetragen. Diese wurden nun für 1 Minute bei 12.000 g zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße übertragen und 1:1 mit 70% Ethanol gemischt und danach auf einem Reaktionsgefäßschüttler vermengt. Die Proben wurden auf die „PerfectBind RNA Column“ gegeben, welche wiederum auf einem Reaktionsgefäß saß, und für 1 Minute bei 10.000 g zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wurde verworfen. Auf die „PerfectBind RNA Column's“ wurde 500 μl des „Waschpuffers 1“ gegeben, und darauffolgend für 15 Sekunden bei 10.000 g zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wurde verworfen. Danach kam für 15 Minuten der „DNase I Reaktionsmix“ aus dem „DNase I Digest Kit“ hinzu. Dieser soll sicherstellen, dass jegliche genomische DNA verdaut wird, damit sich keine Spuren davon in den RNA-

Proben wiederfinden. Nach der Inkubationszeit wurden 400 µl des „Waschpuffers 1“ hinzugegeben, und nochmals für 5 Minuten inkubiert. Die „PerfectBind RNA Column's“ wurden dann für 5 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert und der Säulendurchfluss verworfen. Danach wurden 600 µl des „Waschpuffers 2“ hinzugegeben und für 15 Sekunden bei 10.000 g zentrifugiert, und der Säulendurchfluss verworfen. Dieser Schritt wurde ein zweites Mal wiederholt. Die „PerfectBind RNA Column's“ wurden auf ein frisches Reaktionsgefäß gesteckt und für 2 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert. Dieser Schritt wird als Trocknung bezeichnet. Die „PerfectBind RNA Column's“ wurden nach der Trocknung auf ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt und 50 µl steriles, RNase-freies Wasser direkt auf die Membran gegeben, und für 1 Minute bei 5000 g zentrifugiert. Diesen Schritt bezeichnet man als Elution, wobei die RNA durch das Wasser aus der Membran gelöst wird. Es wurde sich stets an die Angaben des Herstellers gehalten.

2.2.1.7.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Quantifizierung der RNA erfolgte mittels eines Spektralphotometers (NanoDrop 2000c). Dabei wird 1 µl der Probe aufgetragen, und die Absorption bei 260 nm gemessen. Die Berechnung erfolgt dabei nach der abgewandelten Formel des Lambert-Beer'sches Gesetz:

$$c = \frac{A * \epsilon}{b}$$

c = Konzentration [ng/µl]

A = Absorption [AU]

ε = Extinktionskoeffizient

b = Abstand zwischen dem unteren und oberen Lichtleiter [cm]

Der Quotient aus der Absorption von 260 nm und 280 nm gibt die Reinheit der Probe an, und sollte für RNA im Bereich 2,0 liegen. Alle unsere Proben lagen in diesem Bereich.

2.2.2 Zellkultur THP-1

2.2.2.1 Auftauen und Kultivierung der Zellen Zellkultur

In diesem Kapitel wird das Starten der Zellkultur aus dem Stickstofftank beschrieben.

Für die Zellkultur wurde ein Kryoröhrchen mit den THP-1 aus dem Stickstofftank geholt und für 2 Minuten im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Direkt danach wurden die Zellen in 9 ml frisches RPMI-1640 (+10% FKS) überführt und für 5 min bei 200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 2 ml frischem RPMI (+ 5% FKS)

resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann mit 18 ml RPMI (+ 10% FKS) in die T75-Flasche gegeben. Die Kultivierung erfolgte stehend im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel, die Zellen wurden abzentrifugiert, in frischem RPMI-1640-Medium wieder resuspendiert, die Zelldichte mittels der Neubauerzählkammer bestimmt, und danach ein Teil wieder in die neue T75-Zellkulturflasche gegeben. Die Zelldichte innerhalb der T75-Zellkulturflasche betrug bei der Aussaat 1-2*10⁵ Zellen/ml. Der Mediumwechsel erfolgte danach alle 3 Tage für die ersten zwei Wochen, bevor die ersten Experimente durchgeführt werden konnten. Täglich wurden die THP-1 unter dem Mikroskop auf ihre Morphologie beurteilt. Runde, leuchtende und einzelne Zellen deuten auf eine gute Vitalität hin.

2.2.2.2 Ernte und Passagieren

Die Hälfte der Zellsuspension aus einer T75-Flasche wurde aufgenommen und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Im Anschluss wurden die Zellen für 5 Minuten bei 250 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 5 ml frischem Medium (+10% FKS) resuspendiert. Danach wurden die Zellen analog der HUVEC-Zellzählung gezählt (Kap. 2.2.1.3). Nun konnten die Zellen entweder weiter passagiert oder für verschiedene Experimente verwendet werden. Wenn die THP-1 wieder in eine T75-Flasche gegeben wurden, dann wurde die Zellzahl auf 1-2*10⁵ Zellen/ml eingestellt.

2.2.2.3 Gewinnung von Zellkulturüberständen und Behandlung

Nach der Zellernte wurden 1,6*10⁶ THP-1-Zellen in 4 ml Medium (+ 5% FKS) in einer Zellkulturschale (22 cm²) ausgesät und im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag, ca. 24 Stunden später, wurden 4 ml Medium mit den Behandlungssubstanzen in doppelter Konzentration in die Zellkulturschalen gegeben. Die doppelte Konzentration wurde verwendet, da bereits 4 ml Medium mit den Zellen in der Zellkulturschale waren, und sich somit wieder die einfache Konzentration ergibt. Die Schalen kamen nun wiederum für die angegebene Zeit in den Brutschrank. Nach der gewünschten Dauer wurden die Überstände entnommen, für 2 Minuten bei 200 g zentrifugiert und die zellfreien Überstände dann in Schraubröhrchen bei -80°C gelagert.

2.2.3 Ansetzen der Behandlungsreagenzien

Alle Behandlungsreagenzien wurden nach dem Herstellerprotokoll aufgelöst und danach aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Dazu gehören, mit entsprechender Konzentration der Stammlösung in Klammern, Apremilast (10 mM), Roflumilast (10 mM) die verschiedenen MAPK-Inhibitoren (jeweils 20 mM), Resveratrol (10 mM), welche in DMSO gelöst wurde, und TNF α (50 μ g/ml), welches in 0,1% FKS in PBS aufgelöst

wurde. Die Lösungsmittelkontrolle bestand in allen Experimenten aus 4 µl DMSO und 0,4 µl 0,1% FKS in PBS, bezogen auf 1000 µl Medium. Im Folgenden wird anstelle des Wortes Lösungsmittelkontrolle, nur Kontrolle verwendet, um Übersichtlichkeit zu gewährleisten. Analog dazu erfolgten die Behandlungen. Zum Beispiel für die TNF α -Behandlung (20 ng/ml): 4 µl DMSO und 0,4 µl TNF α (50 µg/ml). Für die TNF α (20 ng/ml) + Apremilast (40 µM) Behandlung: 4 µl Apremilast (10 mM) und 0,4 µl TNF α (50 µg/ml). Für die MAPK-Inhibitoren sollte laut Herstellerprotokoll eine höher konzentrierte Stammlösung angesetzt werden, dementsprechend wurden für die Kontrolle und die TNF α -Behandlung größere Volumina an DMSO verwendet. Durch die oben erläuterte Anfertigung der Behandlungssubstanzen im Medium sollte somit ein Effekt der Verdünnungsmittel auf die Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Behandlungsgruppen ausgeschlossen werden. Für die Konzentrationsreihen von Apremilast und Roflumilast wurde die Stammlösung geometrisch (1:2) in DMSO verdünnt, sodass überall die gleichen Volumina an Substanz pipettiert werden konnten.

2.2.4 Zytotoxizitätstest

Zum Ausschluss eines zytotoxischen Effekts von Apremilast und Roflumilast auf die HUVEC wurde ein Laktatdehydrogenase-Test (LDH) durchgeführt. Hierzu wurde das Cytotoxicity Detection Kit (LDH) der Firma Roche verwendet. Die Laktatdehydrogenase kommt ubiquitär in Zellen vor, und wird proportional zur Schädigung der Zellmembran an den Extrazellulärraum abgegeben, in unserem Fall der Überstand (Korzeniewski und Callewaert 1983). Die Laktatdehydrogenase katalysiert im Überstand die Reaktion von Laktat zu Pyruvat, wobei NAD $^{+}$ zu NADH/H $^{+}$ reduziert wird. Durch Zugabe eines Katalysators, einer Diaphorase und dem wasserlöslichen, farblosen Triphenyltetrazoliumchlorid, kann die Diaphorase eine Redoxreaktion katalysieren, wobei das H/H $^{+}$ vom NADH/H $^{+}$ auf das Triphenyltetrazoliumchlorid übertragen und dieses somit zu Formazan reduziert wird. Das wasserunlösliche Formazan ist rot, und so kommt es zu einem Farbumschlag der proportional zur Zellschädigung ist. Das Extinktionsmaximum des entstandenen Formazans liegt bei 492 nm, und kann als Absorption gemessen werden.

Durchführung

Am ersten Tag wurden $1,5 \cdot 10^4$ HUVEC in einer flachen 96-Lochplatte in 200 µl Medium (+ 5% FKS) ausgesät und für ca. 24 Stunden im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 200 µl von verschiedenen Apremilast- und Roflumilast-Konzentrationen in Medium (+ 1% FKS) und den Kontrollen (s.u.) für 24 Stunden

behandelt. Wichtig ist, dass die Behandlung hier in Medium mit 1% FKS stattfindet, da das FKS selbst LDH beinhaltet. Im Folgenden sind die Kontrollen aufgeführt:

- Lösungsmittelkontrolle : DMSO in Medium
- Positivkontrolle : 1 % Triton-X in Medium
- Blindwert : Medium (+ 1% FKS) ohne Zellen

Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen im Brutschrank für 24 Stunden. Nach der Behandlung wurde der LDH-Test durchgeführt. Alle Reagenzien stammen aus dem Kit, es wurde sich stets an die Herstellerangaben gehalten. Der Reagenzien-Mix wird im Verhältnis 1:45 von Katalysator zu Substrat angesetzt. 50 µl des Überstandes wurden vorsichtig mit einer Mehrkanalpipette aufgenommen. Wichtig dabei ist es den Zellrasen nicht zu berühren, um keine Zellen mit aufzunehmen. In einer neuen, unsterilen 96-Lochplatte (U-Form) wurde der Überstand mit 50 µl des Reagenzien-Mix für 30 Minuten in Dunkelheit inkubiert. Gemessen wurde daraufhin die Absorption der einzelnen Proben bei einer Wellenlänge von 492 nm und einer Referenzwellenlänge von 600 nm, um die Differenzwellenlänge zu erhalten. Die Absorbationsmessung erfolgte, wie in allen folgenden Experimenten ebenfalls, mit dem ELISA-Reader Tecan Infinite M200. Der Blindwert wurde danach von allen Werten subtrahiert. Die Lösungsmittelkontrolle wurde auf 100 % gesetzt. Alle Experimente wurden in Triplikaten ausgeführt.

2.2.5 Proliferationstest

Zur Bestimmung des Proliferationsverhaltens der HUVEC unter Behandlung von Apremilast und Roflumilast wurde ein Zellproliferations-Test durchgeführt. Dazu wurde das „Cell Proliferation, ELISA, BrdU (colorimetric)“ Kit der Firma Roche genutzt. Grundlegend beruht der Test auf der Funktionsweise eines direkten ELISA. Zu den Zellen und Substanzen wird Bromdesoxyuridin (BrdU) dazugegeben. BrdU ist ein Pyrimidin-Analogon, welches während der S-Phase des Zellzyklus anstelle von Thymidin in das Genom eingebaut wird. Der Einbau des BrdU verhält sich proportional zur Proliferation der Zellen. Nach Inkubation werden die Zellen fixiert, und ein Anti-BrdU-Antikörper hinzugegeben, der das ins Genom eingebaute BrdU bindet. An den Antikörper ist ein Reporterenzym gekoppelt, die Meerrettischperoxidase (engl. horseradish peroxidase, HRP). Im Anschluss wird das farblose Tetramethylbenzidin (TMB) mit Wasserstoffperoxid hinzugefügt. Die HRP katalysiert die Oxidation von TMB, wobei zwei Elektronen auf das Wasserstoffperoxid übertragen werden, welches zu Wasser reduziert wird. Das TMB wird in Tetramethylbenzidin-Diimin umgewandelt, welches eine blaue Farbe besitzt. Die Inkubation sollte im Dunkeln durchgeführt werden, da Licht das TMB degradieren kann. Beendet wird die Reaktion mit Schwefelsäure, um

eine Absättigung der Enzymreaktion zu vermeiden. Das Extinktionsmaximum des entstandenen Tetramethylbenzidin-Diimin liegt bei 450 nm und kann nun als Absorption gemessen werden.

Durchführung

Analog zum LDH-Test (Kap. 2.2.4) wurden die Zellen ausgesät und inkubiert. Am nächsten Tag wurde den Behandlungssubstanzen BrdU im Verhältnis 1:1000 beigemischt. Im Anschluss wurden die Zellen mit 200 µl der Behandlungssubstanzen und BrdU in Medium (+1% FKS), und den Kontrollen behandelt. Im folgenden sind die Kontrollen aufgeführt:

- Lösungsmittelkontrolle : DMSO in Medium
- Hintergrundkontrolle : Medium + Zellen (kein BrdU)
- Blindwert : Medium (+ 1 % FKS) ohne Zellen

Nach der Behandlung wurde der Proliferationstest wie folgt durchgeführt. Alle verwendeten Reagenzien stammen aus dem Kit, ebenso wurde sich an die Durchführung aus dem Herstellerprotokoll gehalten. Als erstes wurde der Überstand abgesaugt, und die Zellen mittels einer Lösung („Fix Denat“) für 30 Minuten fixiert. Die Antikörper-Arbeitslösung wurde frisch angesetzt und der Anti-BrdU-POD-Antikörper (Stock) darin im Verhältnis 1:100 verdünnt. Die Fixierungsflüssigkeit wurde abgekippt und die Lochplatte leicht abgeklopft. 75 µl der Antikörper-Lösung wurden in jede Vertiefung hinzugefügt und für 60 Minuten inkubiert. Der Waschpuffer wurde im Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser angesetzt, und die Lochplatte nach der Inkubation drei Mal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Direkt im Anschluss wurde in jedes Well 100 µl des TMB-Substrates hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln für ca. 15 Minuten. Zum Abstoppen der Enzymreaktion wurden 50 µl einer 1 M Schwefelsäure pro Vertiefung hinzugegeben. Die Absorptionmessung erfolgte bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm zur Ermittlung der Differenzwellenlänge. Der Blindwert wurde danach von allen Werten subtrahiert. Die Lösungsmittelkontrolle wurde auf 100 % gesetzt. Alle Experimente wurden in Triplikaten ausgeführt.

2.2.6 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) und Zytokin-Array

Der Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), zu Deutsch enzymatisches Immunadsorptionsverfahren, gehört zu den klassischen Immunassayverfahren in der experimentellen Forschung. Die verwendeten ELISA-Kit's beruhen alle auf der Sandwich-Methode, welche im Folgenden erläutert wird. Bei der Sandwichmethode wird

ein sogenannter Fangantikörper (= Primärantikörper) auf einer festen Phase gebunden. Dieser ist spezifisch für das gesuchte Antigen. Optional ist vor der Zugabe der Proben ein Blocken sinnvoll. Oft wird BSA verwendet, welches geeignet ist um unspezifische Bindungsstellen in Immunassays zu blockieren (Steinitz 2000). Zu dem Fangantikörper werden die zu untersuchenden Proben, mit dem gesuchten Antigen, gegeben. Es erfolgt eine Inkubationsdauer, in der die Antigene an die festen Primärantikörper binden können. Zwischen allen aufgeführten Schritten erfolgt ein Waschschrift, bei dem nicht gebundene Antigene oder Antikörper entfernt werden sollen. Als nächstes gibt man den sog. Detektionsantikörper (= Sekundärantikörper) hinzu, der an den Fangantikörper-Antigen-Komplex bindet, und somit bildlich das Sandwich komplettiert. An den Detektionsantikörper sind entweder direkt Reporterenzyme, wie die HRP oder Alkalische Phosphatase (AP) gebunden oder sie sind biotinyliert. Ist kein Reporterenzym gebunden, wie in den hier verwendeten Kit's, sondern ein biotinylierter Detektionsantikörper, muss ein weiterer Schritt erfolgen. Man gibt Avidin hinzu, an welches die HRP gebunden ist. Das Biotin besitzt eine hohe Affinität zu Avidin und der Avidin-HRP-Komplex bindet an den Detektionsantikörper. Dies dient vor allem der Signalverstärkung. Analog zum Proliferationstest wird im letzten Schritt ein Farbstoff, hier das TMB, hinzugegeben, welcher durch die HRP von farblos in Blau oxidiert wird. Der Farbumschlag ist proportional zum gebundenen Antigen. Die enzymatische Reaktion muss gestoppt werden, da sonst ein Plateau erreicht wird. Dazu wurde 1 M Schwefelsäure verwendet. Das Extinktionsmaximum des entstandenen Tetramethylbenzidin-Diimin liegt bei 450 nm und kann nun als Absorption gemessen werden. Um eine Konzentration des gesuchten Antigens zu erhalten, muss eine Standardkurve mit vordefinierten Konzentrationen bei jedem Versuch mitgeführt werden.

Durchführung für ELISA Kit's von BioLegend

Im Folgenden wird der Ablauf in Bezug auf die Inkubationszeiten und Verdünnungen für die ELISA Kit's von BioLegend beschrieben. Dazu gehören: GM-CSF, IL-8, MCP-1, IP-10 und MMP-9. Alle Versuche wurden gemäß der Herstellerangaben durchgeführt. Die Zusammensetzung der Puffer ist in Tab. 2.2 aufgeführt. Zunächst wurde die ELISA-Platte (96-Lochplatte), die feste Phase, mit dem spezifischen Fangantikörper (=Primärantikörper) beschichtet. Dieser wurde zuvor im Beschichtungspuffer („Coating-Buffer“) 1:200 verdünnt. Nach der Inkubationszeit über Nacht bei 4°C, wurde die ELISA-Platte ausgekippt und drei Mal mit 500 µl Waschpuffer gewaschen, wie zwischen allen folgenden Schritten ebenfalls. Der Waschpuffer besteht standardmäßig aus PBS (ohne Ca²⁺/Mg²⁺) und 0,05% Tween. Danach blockt man die unspezifischen Bindungen für 1 Stunde mit 200 µl des Blockpuffers („Blocking-buffer“), der aus PBS (ohne Ca²⁺/Mg²⁺)

mit 5 % BSA besteht. Nach dem Blocken wurde der gesammelte Überstand (Kap. 2.2.1.5) mit den enthaltenen Zytokinen unverdünnt oder verdünnt im Blockpuffer für 2 Stunden aufgetragen. Zusätzlich wurde ein Standard mit definierten Konzentrationen des gesuchten Zytokins aufgetragen, um später die Konzentration in den Proben bestimmen zu können. Die Verdünnung dient v.a. dazu extrem hohe Zytokinkonzentrationen innerhalb der Standardreihe zu halten. Als nächstes wurden 100 µl des biotinylierten Detektionsantikörpers (=Sekundärantikörper), verdünnt im Verhältnis 1:200 im Blockpuffer, für 1 Stunde hinzugegeben. Im vorletzten Schritt kamen 100 µl Avidin-HRP, 1:1000 verdünnt im Blockpuffer, für 30 Minuten hinzu. Zuletzt wurde der Farbstoff TMB für ca. 15 Minuten im Dunkeln pipettiert. Die enzymatische Reaktion wurde mit 1 M Schwefelsäure gestoppt. Die Absorptionmessung erfolgte mit einer Wellenlänge von 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 450 nm im ELISA-Reader. Von der Differenzwellenlänge wurde der Blindwert subtrahiert. Die Umrechnung der Verdünnungen, die Subtraktion des Blindwertes und die Bestimmung der Konzentrationen anhand der Standardkurve wurden von der Software Magelan berechnet. Bei allen durchgeführten Experimenten wurden die Proben in Triplikaten aufgetragen, der Standard in Duplikaten.

Beschichtungspuffer	Blockpuffer
- 8,4 g NaHCO ₃ - 3,56 g Na ₂ CO ₃ - in 1000 ml Aqua Dest.	- 2 g BSA - In 200 ml Aqua Dest.
Waschpuffer (0,05 % Tween)	
- 500 µl Tween-20 - 1 ml NaN ₃ - in 1000 ml PBS	

Tab. 2.2 Zusammensetzung BioLegend ELISA Puffer

Durchführung für ELISA Kit's von Actif motif

Die Durchführung des ELISA für NF-κB ("TransAM NF-κB Family" Kit) von Actif Motif unterscheidet sich in einigen Punkten. Man verwendet keine Zellkulturüberstände sondern nukleäre Proteine. Die Gewinnung von nukleären Proteinen ist in Kap. 2.2.1.6.2 beschrieben. Für die Versuche wurden 4 µg nukleäre Proteine aufgetragen. Außerdem wurde die mitgelieferte Positivkontrolle und ein Blindwert bei jedem Versuch mitgeführt. Auf dem Boden der mitgelieferten 96-Lochplatte sind Oligonukleotide gebunden, welche spezifisch für NF-κB sind. Die nukleären Proteine wurden hinzugegeben und für 1 Stunde inkubiert. Die NF-κB-Heterodimere binden währenddessen an die Oligonukleotide, welche hier die Funktion eines Fangantikörpers besitzen. Danach

wurden die Vertiefungen drei Mal mit 500 µl des mitgelieferten Waschpuffers gewaschen. Das Waschen erfolgt zwischen allen folgenden Schritten. Nun wurden 100 µl des NF-κB-Antikörper, verdünnt im Verhältnis 1:1000 im Antikörperbindungspuffer, für 1 Stunde hinzugegeben. Dieser bindet spezifisch nur Epitope von NF-κB, welche zugänglich sind wenn NF-κB an die DNA gebunden und damit aktiviert ist. Nach der Inkubation wurde der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper, 1:1000 im Antikörperbindungspuffer verdünnt, für 1 Stunde hinzugegeben. Im vorletzten Schritt wurde der Farbstoff 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) pipettiert und dann im Dunkeln für 5 Minuten inkubiert. Analog zur Durchführung der ELISA von BioLegend erfolgte das Abstoppen der Reaktion und die Messung der Absorption.

Zytokin-Array

Der Zytokin-Array ermöglicht eine Vielzahl von Zytokinen oder anderen Zielstrukturen gleichzeitig zu untersuchen, ermöglicht allerdings keine quantitative Bestimmung von Konzentrationen. Er wurde zu Beginn verwendet, welche unter dem Einfluss von TNFα vermehrt sezerniert werden, und unter der Hinzugabe von Apremilast möglicherweise inhibiert werden. Im Folgenden wird das Protokoll des hier in der Arbeit verwendeten Zytokin-Arrays von „Raybio human Cytokines“ dargestellt. Alle verwendeten Puffer entstammen dem Kit. Für den Versuch wurden Zellkulturüberstände nach 24 Stunden Behandlung mit der Lösungsmittelkontrolle, TNFα (20 ng/ml) und TNFα+Apremilast (40 µM) verwendet.

Auf der folgend genannten Membran sind die Fangantikörper für das jeweilige Zytokin bereits nach festgelegtem Schema fest angebracht. Die Membran wurde zuerst mit dem Blockpuffer 30 Minuten gegeben bei Raumtemperatur inkubiert, danach entfernt und die Überstände hinzugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Überstände entfernt, und die Membran drei Mal mit dem Waschpuffer I für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, und danach mit dem Waschpuffer II drei Mal für 5 Minuten. Danach wurde das bereitgestellte, biotinylierte Sekundärantikörper-Gemisch hinzugegeben, und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Sekundärantikörper entfernt, und die zwei zuvor genannten Waschschrte erneut durchgeführt. Die Membran wurde auf eine Plastikfolie gelegt und das Avidin-HRP-Gemisch (1:1000 in Blockpuffer) für 2 Stunden bei Raumtemperatur raufgegeben. Danach erfolgten wieder die Waschschrte. Danach wurde das Detektionspuffergemisch (Detektionspuffer C und D) für 5 Minuten auf die Membran gegeben. Darauf folgte dann eine weitere Plastikfolie. Anders als bei den anderen ELISA-Kit's wird hier allerdings kein Farbsignal gemessen, sondern ein Chemilumineszenz-Signal mittels einem Chemilumineszenz-Analysegerät.

2.2.7 Westernblot

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht, bzw. ihrer negativen Ladung in einem Gel mit Poren, entlang eines elektrischen Feldes aufgetrennt. Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Detergens, welches die Aminosäuren des Proteins bindet, dadurch die Eigenladung des Proteins überdeckt und somit eine kontinuierlich negative Ladung entsteht. Die negative Ladung des Proteins ist somit proportional zur Größe bzw. Masse des Proteins. Die Ladungen stoßen sich voneinander ab, sodass SDS gleichzeitig zur Linearisierung der Proteine beiträgt. Wie schnell die Proteine durch das Gel im elektrischen Feld wandern, entscheidet zum einen der angelegte Strom, die negative Ladung eines Proteins und die Größe der Poren. Das Polyacrylamid als Bestandteil des Gels bildet abhängig von seiner Konzentration Poren im Gel, welche für die Proteine als eine Art Sieb dient. Je höher der Polyacrylamidanteil ist, desto größer sind die Poren.

Für die Durchführung der SDS-PAGE wurde eine sogenannte Elektrophoresekammer verwendet, bei der ein gerichteter Strom angelegt werden kann. Zu Beginn wurden die Gele zwischen die Glasplatten (1 mm Abstand) gegossen. Zuerst wurde das Trenngel hinzugegeben und dieses mit Ethanol (70%) überschichtet, um Unebenheiten und Blasen zu verhindern. Nach ca. 15 Minuten Inkubation war das Trenngel polymerisiert, das Ethanol wurde abgegossen, das Sammelgel hinzugegeben und die Kämme zur Bildung der Taschen im Gel eingesteckt. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tab. 2.3 aufgeführt. Die dazugehörige Zusammensetzung der Puffer ist am Ende des Kapitels in Tab 2.4 aufgeführt.

Substanz	Trenngel 2 Gele a 12%	Sammelgel 2 Gele a 6%
Wasser	4 ml	3 ml
Polyacrylamid (30%)	4 ml	1 ml
Trenngelpuffer pH 8,8	2 ml	-
Sammelgelpuffer pH 6,8	-	2 ml
TEMED	20 µl	4 µl
APS	100 µl	80 µl

Tab. 2.3 Zusammensetzung der Gele für den Westernblot

Während die Gele polymerisieren wurden die aufzutragenden Proben vorbereitet. Nach den Ergebnissen der Proteinbestimmung wurden die Proben im jeweiligen Lysepuffer so verdünnt, dass für jede Probe die gleiche Proteinkonzentration besteht, und somit die

gleiche Menge an Protein aufgetragen werden konnte. Die Proben wurden dann im Verhältnis 4:1 mit dem vierfachen Lämmli Probenpuffer versetzt. Dieser enthält das SDS, dessen Funktion im oberen Teil beschrieben ist und Bromphenolblau, welches den Proben eine blaue Farbe gibt, damit diese im Gel zu erkennen sind. Die angesetzten Proben wurden danach auf 95°C für 3 Minuten erhitzt, um die Sekundär- bzw. Tertiärstruktur der Proteine zu lösen. Die Erhitzung wirkt damit synergistisch mit dem hinzugefügten SDS. Die Gele zwischen den Glasplatten wurden in die Elektrophoresekammer eingesetzt, die Kämme vorsichtig herausgezogen und die Elektrophoresekammer mit dem Laufpuffer (Westernblot-Puffer s.u.) befüllt. In die entstandenen Taschen wurden 20 µl der vorbereiteten Proben pipettiert, und pro Gel außerdem mindestens ein Marker. Dieser dient am Ende der Abschätzung auf welcher Höhe des Gels das gesuchte Protein liegen muss, um v.a. unspezifische Banden nicht mit dem Zielprotein zu verwechseln. Die Proteine durchliefen bei 80 Volt das Sammelgel, welches die Aufgabe hat die Proteine an der Grenze zum Trenngel zu konzentrieren, um damit scharfe Banden zu erhalten. Sobald die Proteine im Trenngel sind, wurde die Spannung auf ca. 120 Volt erhöht und für ca. 1 Stunde laufen gelassen. Nachdem der Marker sich aufgetrennt hat und bevor die Proteine am Ende des Gels auslaufen, wurde der Strom abgeschaltet und die Glasplatten mit den Gelen aus der Kammer genommen. Die Gele wurden herausgelöst und in den Transferpuffer überführt. Die dazugehörigen Puffer sind am Ende des Kapitels aufgeführt.

Proteintransfer

Im nächsten Schritt wurden die Proteine aus den Gelen auf eine spezielle Membran übertragen werden. Dieser Vorgang wird als „Blotten“ bezeichnet und dient vor allem dazu die untersuchten Proteine/Proben haltbar zu machen und auswerten zu können. Die für die Westernblots verwendete Membran ist eine PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid). Um die Proteine vom Gel auf die Membran transferieren zu können, wurden diese in einer Kassette zu einem Sandwich nach folgendem Schema aufeinandergelegt: Schwamm, Lösch-Papier, PVDF-Membran, Gel, Lösch-Papier und wieder der Schwamm. Die Schwämme dienen dazu das Gel gleichmäßig auf die Membran zu pressen, und die Lösch-Papiere verhindern eine Austrocknung von Gel und Membran. Die Kassetten wurden dann in die Transferkammer eingesetzt und diese mit extra dafür angesetzten Transferpuffer befüllt. Die Zusammensetzung des Transferpuffers sowie der weiteren verwendeten Puffer wird am Ende aufgeführt. Der Strom wird so angelegt, dass sich die negativ geladenen Proteine aus dem Gel Richtung Anode bewegen und somit auf die PVDF-Membran transferiert werden. Dafür wurden 100 Volt für ca. 60 Minuten verwendet.

Blocken

Nach dem Transfer wurden die Gele verworfen, die Membranen beschriftet und diese entweder in 5% BSA in „Tris-buffered saline with Tween20“-Puffer (TBS-T) oder 5% Milchpulver (MP) in TBS-T für 60 Minuten geblockt. Dies soll verhindern, dass der Primärantikörper an unspezifische Proteine bindet und somit keine unspezifischen Banden entstehen.

Primärantikörper

Der Blockpuffer wurde verworfen und der gewünschte Primärantikörper (1:1000 im jeweiligen Blockpuffer, außer GPADH 1:5000) auf die jeweiligen Membranen gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler. Die hier verwendeten Primärantikörper sind in Kap. 2.1.5.1 aufgeführt.

Sekundärantikörper

Am nächsten Tag wurden die Membranen in TBS-T drei Mal für 10 Minuten gewaschen, um die nicht gebundenen Primärantikörper zu entfernen. Danach wurden die entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (1:2000 im jeweiligen Blockpuffer) für 2 Stunden hinzugegeben. Im Anschluss wurden die Sekundärantikörper aufgefangen, und die Membranen wieder drei Mal für 10 Minuten in TBS-T gewaschen. Die hier verwendeten Sekundärantikörper sind in Kap. 2.1.5.2 aufgeführt.

Analyse mittels Chemilumineszenz

Die Membranen wurden zur Auswertung für 5 Minuten in einer dunklen Kammer mit einer Luminol-Lösung beschichtet. Die an die Sekundärantikörper gebundene HRP katalysiert mittels Wasserstoffperoxids eine Reaktion bei der das Luminol in einen energiereicheren Zustand angehoben wird und dabei ein Photon emittiert. Dies wird als „enhanced chemiluminescence“ (ECL) bezeichnet. Das Chemilumineszenzsignal wurde daraufhin mittels eines Chemilumineszenz-Analysegerätes gemessen.

Auswertung

Die optische Dichte der einzelnen Banden wurde mittels ImageJ densitometrisch gemessen und ausgewertet. Für die statistische Auswertung und die Diagramme der verschiedenen MAPK und p65 (und deren phosphorylierten Formen) diente die Kontrolle (=100%) als Ausgangspunkt, für die Adhäsionsrezeptoren TNF α (=100%).

Laufpuffer	Waschpuffer (TBS-T)
- 25 mM Tris Base - 250 mM Glycin - 0,1% SDS - in Aqua a dest.	- 200 mM Tris Base - 140 mM NaCl - 1% Tween-20 - in Aqua a dest.
Transferpuffer	5x Sammelgelpuffer (pH 6,8)
- 25 mM Tris Base - 192 mM Glycin - 10% Methanol - in Aqua a dest.	- 1,5 M Tris Base Hydrochlorid - 0,4% SDS-Lösung - in Aqua a dest.
5x Trenngelpuffer (pH 8,8)	
- 1,5 M Tris Base - 0,4% SDS-Lösung - in Aqua a dest.	

Tab. 2.4 Zusammensetzung Westernblot-Puffer

2.2.8 Semiquantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und Kapilläre Gelelektrophorese

Für die Untersuchung von mRNA-Produkten, also der Wirkung auf transkriptioneller Ebene, wurde eine Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) mit anschließender kapillärer Gelelektrophorese verwendet und anschließend ausgewertet.

Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Zur Amplifikation der Proben wurde zunächst eine RT-PCR durchgeführt. Dafür wurde das „OneStep-PCR“ Kit von biotechrabbit verwendet. Es wurde sich stets an die Herstellerangaben gehalten. Im Folgenden wird der allgemeine Ablauf einer RT-PCR geschildert und im letzten Teil die exakte Durchführung. Im ersten Schritt wird mittels einer RNA-abhängigen reversen Transkriptase die gesammelte mRNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Danach wird die cDNA mittels spezifischer Primer für die gesuchte mRNA, freier Oligonukleotide und einer thermostabilen DNA-abhängigen DNA-Polymerase in mehreren Zyklen amplifiziert. Die Zyklen sind dabei immer gleich aufgebaut. Zuerst erfolgt die Denaturierung, bei der die DNA-Doppelstränge bei ca. 95°C voneinander getrennt werden. Danach erfolgt die Primerhybridisierung bei ca. 60°C, wo sich die Primer an die spezifischen DNA-Abschnitte der Einzelstränge anlagern. Im letzten Schritt erfolgt die Elongation, auch

Polymerisation genannt. Die DNA-Polymerase erkennt die Primer und füllt vom 3'-Ende an die passenden Nukleotide zum Einzelstrang auf. Die Zyklenzahlen und Primerhybridisierungstemperaturen sind von Primer zu Primer unterschiedlich. Am Ende erhält man viele Amplifikate des gesuchten DNA-Abschnittes. Das besonderes am OneStep-Kit ist, dass diese Reaktionen in einem Reaktionsgefäß stattfinden. Für jede Bedingung wurde der in Tab. 2.5 aufgeführte Mix angesetzt.

Reagenz	Volumen
One-Step Mix (Hot Start Taq DNA-Polymerase, dNTP's, MgCl ₂ , Stabilisatoren)	25 µl
RT-RI Blend (Reverse Transkriptase, Ribonuklease- Inhibitor)	2,5 µl
Vorwärts-Primer (10 mM)	2 µl
Rückwärts-Primer (10 mM)	2 µl
RNA (500 ng)	X µl (siehe unten)
Wasser (RNase-frei)	X µl (siehe unten)
Gesamtmenge	50 µl

Tab. 2.5: Zusammensetzung für einen Ansatz der RT-PCR nach dem „OneStep-PCR-Kit“

Eingesetzt wurden für alle Versuche 500 ng RNA. Das Volumen der RNA-Menge ergibt sich aus der vorher berechneten individuellen Konzentration. Das Volumen des Wassers ergibt sich aus dem fehlenden Volumen bis 50 µl Gesamtmenge. Es wurde stets eine Kontrolle ohne RNA, nur mit Wasser, mitgeführt. Die Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer sind in Kap. 2.1.6 aufgelistet. In der nachfolgenden Tab 2.6 sind die unterschiedlichen Temperaturen und Zeitspannen der einzelnen RT-PCR-Reaktionen aufgelistet. Für die Amplifikation von β -Aktin und GM-CSF waren lediglich die Temperatur für die Primer-Hybridisierung und die Zyklenzahl unterschiedlich.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
cDNA Synthese	50°C	15 Minuten	1
Initiale Aktivierung	95°C	2 Minuten	1
Denaturierung	95°C	10 Sekunden	36: GM-CSF 30: β -Aktin
Primer- hybridisierung	64°C: GM-CSF 58°C: β -Aktin	10 Sekunden	
Elongation	72°C	10 Sekunden	
Finale Elongation	72°C	5 Minuten	1

Tab. 2.6 Ablauf der RT-PCR mit Temperatur, Zeit und Zyklenzahl

Kapilläre Gelelektrophorese

Die gewonnenen DNA-Amplifikate wurden nach der RT-PCR mittels kapillärer Gelelektrophorese aufgetrennt und die Konzentrationen der GM-CSF- und β -Aktin mRNA bestimmt. Für dieses Verfahren wurde das „Qiaxcel Advanced System“ mit dem dazugehörigem „DNA Fast Analysis“ Kit verwendet. Das „DNA Fast Analysis“ Kit enthält eine Gelkartusche (QIAxcel DNA Fast Analysis Cartidge), verschiedene Puffer, einen Kalibrierungsmarker (QX Intensity Calibration Marker), einen Ausrichtungsmarker (QX Alignment Marker 15 bp/3 kb) und einen DNA-Marker (QX DNA Size Marker 50 bp – 1.5 kb). Diese wurden in allen Experimenten verwendet. Die Funktionsweise ist ähnlich der Gelelektrophorese, welche im Folgenden beschrieben wird. Die Proben werden von dem Gerät in Kapillaren gesaugt, welche eine Polymermischung enthalten. Danach wird an den Kapillaren ein Strom angelegt, an dem die unterschiedlich großen DNA-Fragmente entlangwandern. Je nachdem wie viele Basenpaare ein Fragment hat, wandert es unterschiedlich schnell und damit auch weit. Parallel dazu läuft in einer Kapillare eine sogenannte DNA-Leiter mit, welche später zur Orientierung der eigenen Proben dient. Je nachdem wo in der Kapillare das DNA-Fragment nach dem Durchlauf zum Erliegen kommt, bildet sich eine Bande, welche man in der QIAxcel Screen Gel Software auswerten kann. In der Polymermischung befindet sich eine lichtreagible Substanz, welche mit den Nukleinsäuren interagiert. Mittels eines Lasers werden diese angeregt, das Lichtsignal durch einen Detektor aufgefangen und mit der Software in ein Bild bzw. eine Bande umgewandelt. Mit der DNA-Leiter kann man erstens überprüfen, ob die angezeigte Bande auf der erwarteten Höhe liegt und zweitens wird durch eine vorgegebene Konzentration der Banden innerhalb der Leiter, die Konzentration der amplifizierten DNA bestimmt. Um auszuschließen, dass die Banden unspezifischer Natur sind, wurde stets die Kontrollprobe aus der RT-PCR ohne RNA mitgeführt. Die Basenpaarlänge von GM-CSF liegt bei 238 bp und von β -Aktin bei 315 bp. Für die Auswertung wurden die Konzentrationen von GM-CSF auf die dazugehörige β -Aktin-Konzentration normalisiert.

2.2.9 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Bei der Immunfluoreszenz werden Zellbestandteile und Zielproteine mittels fluoreszierender Antikörper und anderer Wirkstoffe unter dem Mikroskop sichtbar gemacht. Angefärbt wurden das p65 durch einen Primärantikörper und einen Sekundärantikörper (AlexaFluor 555-AK), das F-Aktin, ein Bestandteil des Zytoskeletts mittels Phalloidin (FlashPhalloidin Green 488) und die DNA, als Markierung des Zellkerns mittels 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, in ProLong™ Diamond Antifade

Mountant with DAPI). Um die automatisierte Fluoreszenzmikroskopie mit einem Analysegerät zu ermöglichen, wurden die HUVEC auf Deckgläsern in einer 24-Lochplatte ausgesät. Diese wurden vorher mit 0,1% Gelatine in PBS beschichtet und für 10 Minuten inkubiert. Danach wurden $2 \cdot 10^4$ HUVEC 700 μ l Medium (+ 5% FKS) in die Vertiefungen gegeben und für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach dem Anwachsen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen für 4 Stunden mit den verschiedenen Substanzen in 500 μ l Medium (+ 5% FKS) behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium mit den Behandlungssubstanzen verworfen, die Zellen mit 300 μ l 4% Paraformaldehyd in PBS für 10 Minuten fixiert und danach drei Mal mit 500 μ l PBS gewaschen. Nun wurden 200 μ l des p65-Antikörper (1:400 in 5% BSA, 5%igem Ziegen-Serum und 0,2% Triton-X in PBS) hinzugegeben und die Lochplatte über Nacht bei 4°C inkubiert. Das BSA und Ziegenserum dienen der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen und das Triton-X für die Erhöhung der Permeabilität von Zell- und Zellkernwand. Am nächsten Tag wurden wieder drei Mal mit 500 μ l PBS gewaschen und der sekundäre Antikörper AlexaFluor 555 (1:1000 in 0,1% BSA, 0,1% Ziegen-Serum und 0,2% Triton-X in PBS) für 1 Stunde dazugegeben. Darauf folgte die Inkubation mit FlashPhalloidin Green 488 (1:20 in PBS) für 15 Minuten. Als letztes wurden die Deckgläschen mittels einer Pinzette rausgehoben, und mit einer DAPI-haltigen Lösung (ProLong™ Diamond Antifade Mountant with DAPI) auf Objektträgern eingedeckt. Dies färbt nicht nur den Zellkern an, sondern reduziert ebenfalls den Verlust der Fluoreszenzkraft. Die Objektträger wurden daraufhin in einer Mappe bei 4°C im Dunkeln gelagert. Die Aufnahme der Fluoreszenzbilder erfolgte mit dem Axio Scan.Z1. Für die einzelnen Zielobjekte wurden unterschiedliche Wellenlänge am Gerät eingestellt. Das spezifische Extinktionsmaximum von AlexaFluor 555 (p65) liegt bei 555 nm, für FlashPhalloidin Green 488 (Zytoskelettfärbung) bei 488 nm und für das DAPI (DNA) bei 461 nm. Es erfolgte keine Quantifizierung des Fluoreszenzsignals und dient somit vor allem zur Darstellung der Lokalisation der Zielstrukturen. Trotzdem wurde das Experiment vier Mal wiederholt, um einen Zufallseffekt auszuschließen.

2.2.10 Funktionelle Untersuchungen

2.2.10.1 Adhäsion

Für die Untersuchung der Adhäsion von THP-1 an HUVEC wurde der „CytoSelect Leukozyte Endothelium Adhesion Assay“ von Cell Biolabs verwendet. Zuerst wurden $3 \cdot 10^4$ HUVEC in 100 μ l Medium (+ 5% FKS) in einer mit 0,1% Gelatine beschichteten 96-Lochplatte ausgesät und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Nach ca. 24 Stunden haben die HUVEC eine 100%ige Konfluenz erreicht, bilden also

einen geschlossenen Zellrasen. Daraufhin wurden die HUVEC mit den verschiedenen Behandlungssubstanzen für 10 Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Bevor die 10 Stunden Inkubationszeit verstrichen waren, wurden die THP-1-Zellen geerntet und auf 1*10⁶ Zellen/ml in serumfreiem RPMI-Medium eingestellt. Der THP-1-Zellsuspension wurde der Leukotracker (1:500) aus dem Kit hinzugefügt und diese daraufhin für 1 Stunde im Brutschrank inkubiert. Danach wurden sie zwei Mal gewaschen, indem sie für 2 Minuten zentrifugiert und dann in serumfreien RPMI resuspendiert wurden. Die THP-1-Zellen wurden anschließend auf 0,25*10⁶ Zellen/ml eingestellt. Das Medium mit den Behandlungssubstanzen wurde nach 10 Stunden von den HUVEC abgesaugt und 200 µl (50.000 Zellen) der markierten THP-1-Zellsuspension hinzugegeben. Die Co-Kultur wurde dann für 1 Stunde im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt, und drei Mal mit dem Waschpuffer aus dem Kit gewaschen, um die nicht gebundenen THP-1-Zellen zu entfernen. Die HUVEC und gebundenen THP-1-Zellen wurden dann mit dem Lysepuffer aus dem Kit für 5 Minuten auf dem Schüttler lysiert und 100 µl auf einer frischen 96-Lochplatte aufgetragen. Die Fluoreszenzintensität wurde dann im ELISA-Reader bei 480 nm/520 nm gemessen. Die Experimente wurden in Triplikaten ausgeführt.

2.2.10.2 Transmigration

Für die Untersuchung der Transmigration von THP-1-Zellen durch einen HUVEC-Zellrasen wurden Einsätze mit Poren (8 µM) in eine 24-Lochplatte gesetzt. Zuerst wurden die Einsätze in die 24-Lochplatte gesteckt und mit 0,1%iger Gelatine in PBS für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die Gelatine abgesaugt, und in die untere Kammer 500 µl Medium (+ 5% FKS) gegeben. In den Einsatz wurden 8*10⁴ HUVEC in 100 µl Medium (+ 5% FKS) pipettiert und die Platte dann im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde sowohl das Medium aus der unteren Kammer als auch aus dem Einsatz abgesaugt und frisches hinzugegeben. Am dritten Tag wurde überprüft ob die HUVECs einen geschlossenen Zellrasen bilden. Insofern eine 100%ige Konfluenz erreicht wurde, wurde das Medium abgesaugt und die HUVECs behandelt. Die Behandlungssubstanzen wurden in die untere Kammer (500 µl) und in den Einsatz (100 µl) gegeben. Die HUVEC wurden daraufhin für 24 Stunden mit den Behandlungssubstanzen im Brutschrank inkubiert. Bevor die Behandlungszeit verstrichen war, wurden die THP-1-Zellen geerntet und in serumfreiem RPMI-Medium resuspendiert und auf 3*10⁶ Zellen/ml eingestellt. Pro Milliliter der THP-1-Zellsuspension wurde dann 5 µl BCECF (5 µg/ml) hinzugegeben. Dies ist ein etablierter Fluoreszenzfarbstoff zur Markierung von Zellen (Gerhardt et al. 2015). Die Zellsuspension wurde dann für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Danach wurden sie

zwei Mal gewaschen, indem sie für 2 Minuten bei 250 g zentrifugiert und dann in serumfreien RPMI resuspendiert und anschließend auf $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt wurden. In eine frische 24-Lochplatte wurden dann 500 μ l RPMI-Medium (10% FKS) pipettiert. Aus der 24-Lochplatte mit den HUVEC wurde das Medium abgesaugt und die Einsätze in die neue 24-Lochplatte mit dem RPMI-Medium (10% FKS) eingesetzt. In den Einsatz wurden dann 100 μ l (100.000 Zellen) der markierten THP-1 pipettiert. Die Co-Kultur wurde für 4 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Einsätze herausgenommen und 150 μ l aus der unteren Kammer mit den transmigrierten, markierten THP-1-Zellen auf eine 96-Lochplatte in Duplikaten aufgetragen. Das Fluoreszenzsignal wurde im ELISA-Reader bei 480 nm/520 nm gemessen.

2.2.11 Statistik und Diagramme

Die Diagramme wurden mit Prism5 for Windows erstellt. Hier erfolgte ebenfalls die statistische Berechnung. Zur Bestimmung der Signifikanzen zwischen den jeweils den zwei Gruppen wurde der t-test verwendet. In den Diagrammen wird ein Stern (*) für ein Signifikanzniveau $p < 0,05$ verwendet, zwei Sterne (**) für ein Signifikanzniveau von $p < 0,01$ und drei Sterne (***) für ein Signifikanzniveau $p < 0,001$. Zusätzlich sind in den Diagrammen der Standardfehler (SEM) angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von Apremilast und Roflumilast auf Zytotoxizität und Proliferation in Endothelzellen

Vor Beginn der eigentlichen Experimente mit aktivierten Endothelzellen wurden Konzentrationen für Apremilast und Roflumilast ermittelt, die weder einen zytotoxischen noch proliferativen Einfluss besitzen, um diese Effekte in späteren Experimenten auszuschließen.

Zytotoxizität

Für die Bestimmung der Zytotoxizität diente ein LDH-Freisetzungs-Versuch. In Abb. 3.1 A ist zu sehen, dass Apremilast im Bereich von 2,5 μM -40 μM keine zytotoxischen Effekte in HUVEC im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle vermittelt. Die Positivkontrolle führte erwartungsgemäß zu einer signifikant erhöhten LDH-Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle. In Abb. 3.1. B ist zu erkennen, dass bei Roflumilast ab einer Konzentration von 20 μM im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle signifikant zytotoxische Effekte auftreten, welche bei Verdoppelung der Konzentration deutlich zunehmen.

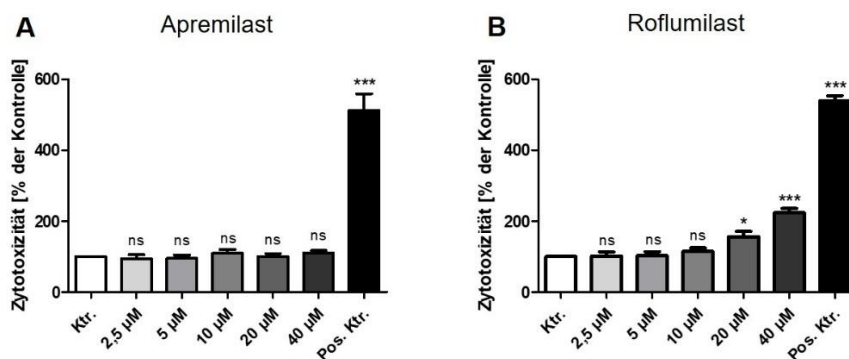


Abb. 3.1: Konzentrationsabhängiger Einfluss von Apremilast und Roflumilast auf die Zytotoxizität in HUVEC. Die HUVEC wurden für 24 Stunden mit der Lösungsmittelkontrolle, der Positivkontrolle 1% Triton X-100, Apremilast (Abb. 3.1 A) oder Roflumilast (Abb. 3.1 B) in den Konzentrationen 2,5 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM , 40 μM behandelt. Dargestellt sind die prozentualen Werte ausgehend von der Lösungsmittelkontrolle (=100%). Die Mittelwerte werden dargestellt \pm SEM. *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$; ns $> 0,05$ versus Lösungsmittelkontrolle ($n=6$). Lösungsmittelkontrolle (Ktr.), Positivkontrolle (Pos. Ktr.), Konzentrationen der Behandlungssubstanzen in μM .

Proliferation

Für die Bestimmung der Proliferation diente ein BrdU-Inkorporations-Versuch. In Abb. 3.2 A ist zu erkennen, dass Apremilast in den Konzentrationen von 2,5 μM -40 μM keinen proliferativen bzw. antiproliferativen Effekt auf die Zellen ausübt. Die Abb. 3.2 B zeigt,

dass Roflumilast hingegen nur bis 10 μM keine antiproliferativen Effekte im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle vermittelt. Ab 20 μM kommt es zu einer signifikanten Wachstumshemmung, welche bei Erhöhung der Konzentration auf 40 μM noch weiter zunimmt. Aufgrund der zytotoxischen und antiproliferativen Effekte von Roflumilast ab 20 μM wurde in allen weiteren Experimenten, die Höchstkonzentration auf 10 μM gesetzt.

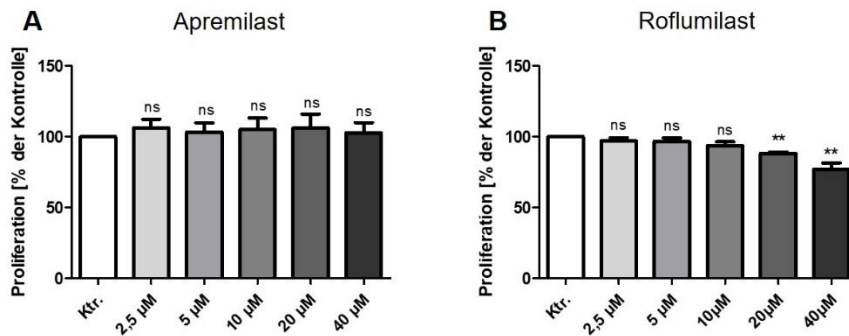


Abb. 3.2: Konzentrationsabhängiger Einfluss von Apremilast und Roflumilast auf die Proliferation von HUVEC. Die HUVEC wurden für 24 Stunden mit der Lösungsmittelkontrolle, Apremilast (Abb. 3.2. A) oder Roflumilast (Abb. 3.2 B) in den Konzentrationen 2,5 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM , 40 μM behandelt. Dargestellt sind die prozentualen Werte ausgehend von der Kontrolle (=100%). Die Mittelwerte werden dargestellt \pm SEM. *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$; ns $> 0,05$ versus Lösungsmittelkontrolle ($n=5$). Lösungsmittelkontrolle (Ktr.), Konzentrationen der Behandlungssubstanzen in μM .

3.2 Effekte von Apremilast und Roflumilast auf die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Sekretion proatherogener Zytokine

Über die Wirkung von Apremilast auf entzündlich aktivierte Endothelzellen in Bezug auf die Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine ist wenig bekannt. Die Arbeitsgruppe um Wang und Kollegen konnte etwa zeitgleich zeigen, dass Apremilast in oxLDL-stimulierten humanen aortalen Endothelzellen die Sekretion von $\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-8 und MCP-1 hemmt (Wang et al. 2020). Nach den Versuchen zur Zytotoxizität und Proliferation sollte nun der Einfluss auf die Sekretion proinflammatorischer Zytokine untersucht werden.

Zytokin-Array

Zur Übersicht möglicher Zytokine, welche durch Apremilast reguliert werden, wurde ein Zytokin-Array durchgeführt. In Abb. 3.3 sieht man zunächst an den Positivkontrollen (1A-D) sowie Negativkontrollen (1E-F), dass die Durchführung des Tests funktioniert. Im

Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ist unter TNF α -Stimulation (20 ng/ml) ein deutliches Signal bei CXCL5/ENA-78 (1G), GM-CSF (1I), GRO a/b/g (1J), IL-6 (2H), CCL5/RANTES (4B), CXCL6/GCP-2 (6G), CXCL10/IP-10 (7D) zu erkennen. Für CCL2/MCP-1 (3E) und CXCL8/IL-8 (2J) scheint es zu keiner vermehrten Sekretion zu kommen. Bei der Behandlung von TNF α (20 ng/ml) + Apremilast (40 μ M) kann bei einigen Zytokinen augenscheinlich eine verminderte Sekretion beobachtet werden. Dazu gehören GM-CSF (1I) und IP-10 (7D). Für CCL2/MCP-1 (3E) und CXCL8/IL-8 (2J) scheint sogar eine Zunahme möglich. Die Quantifizierung dieser beiden Zytokine und weiterer sollte nun mittels ELISA-Verfahren erfolgen.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	ENA-78 (CXCL5)	G-CSF	GM-CSF	GRO a/b/g	GRO alpha (CXCL1)
2	I-309 (CCL1)	IL-1 alpha (IL-1 F1)	IL-1 beta (IL-1 F2)	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8 (CXCL8)	IL-10
3	IL-12 p40/p70	IL-13	IL-15	IFN-gamma	MCP-1 (CCL2)	MCP-2 (CCL8)	MCP-3 (CCL7)	M-CSF	MDC (CCL22)	MIG (CXCL9)	MIP-1 beta (CCL4)
4	MIP-1 delta	RANTES (CCL5)	SCF	SDF-1 alpha	TARC (CCL17)	TGF beta 1	TNF alpha	TNF beta (TNFSF1B)	EGF	IGF-1	Angiogenin
5	OSM	TPO	VEGF-A	PDGF-BB	Leptin	BDNF	BLC (CXCL13)	Ck beta 8-1 (CCL23)	Eotaxin-1 (CCL11)	Eotaxin-2 (CCL24)	Eotaxin-3 (CCL26)
6	FGF-4	FGF-6	FGF-7 (KGF)	FGF-9	FLT-3 Ligand	Fractalkine (CX3CL1)	GCP-2 (CXCL6)	GDNF	HGF	IGFBP-1	IGFBP-2
7	IGFBP-3	IGFBP-4	IL-16	IP-10 (CXCL10)	LIF	LIGHT (TNFSF14)	MCP-4 (CCL13)	MIF	MIP-3 alpha	NAP-2 (CXCL7)	NT-3
8	NT-4	OPN (SPP1)	OPG (TNFRSF11)	PARC	PLGF	TGF beta 2	TGF beta 3	TIMP-1	TIMP-2	POS	POS

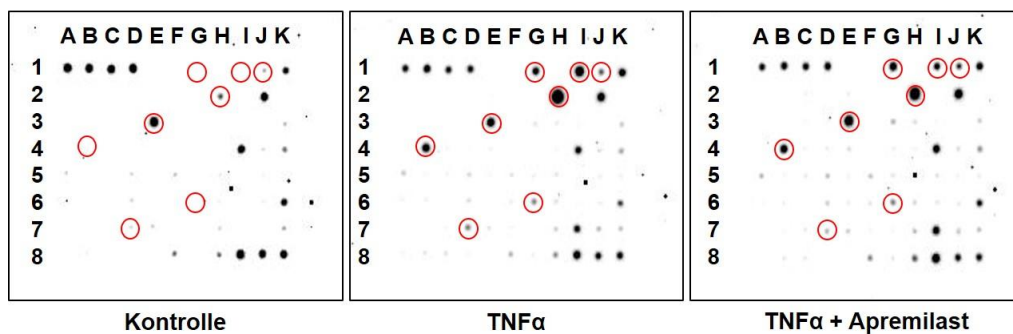


Abb. 3.3: Apremilast inhibiert die Sekretion verschiedener proinflammatorischer Zytokine in TNF α -stimulierten HUVEC (Zytokin-Array). Die HUVEC wurden für 24 Stunden mit der Lösungsmittelkontrolle (=Kontrolle), TNF α (20 ng/ml) alleine, oder TNF α (20 ng/ml) in Kombination mit Apremilast (40 μ M) behandelt. Die gewonnenen Überstände wurden auf dem Zytokin-Array aufgetragen und durch eine Chemilumineszenzkamera aufgenommen (n=1).

Einzelzytokine

Die im Zytokin-Array vielversprechenden Zytokine GM-CSF und IP-10 wurden mittels des ELISA-Verfahrens untersucht werden, um das Vorergebnis aus dem Zytokin-Array zu bestätigen und um eine quantitative Aussage treffen zu können. Zusätzlich zu diesen beiden Zytokinen wurden MCP-1 und IL-8 eingeschlossen. Zunächst einmal ist in Abb. 3.4 (A und B) ersichtlich, dass unter der Lösungsmittelkontrolle und Apremilast bzw. Roflumilast alleine für IP-10 und GM-CSF keine Konzentration gemessen werden

konnte. Für MCP-1 und IL-8 zeigte sich jedoch bereits eine erhöhte Basalsekretion. Im Vergleich zur Kontrolle sieht man unter der TNF α -Stimulation einen deutlichen Anstieg der Sekretion aller abgebildeten Zytokine. In Abb. 3.4 (A) ist sichtbar, dass Apremilast in einer Konzentration von 40 μ M signifikant die Sekretion von GM-CSF und IP-10 in TNF α -stimulierten Endothelzellen im Vergleich zu TNF α allein inhibiert. Auch die Sekretion von MCP-1 konnte signifikant gehemmt werden, allerdings nicht so potent wie die von GM-CSF und IP-10. Die TNF α -stimulierte IL-8 Sekretion konnte hingegen durch Apremilast nicht reduziert werden. Wie an der Konzentrationskala zu erkennen ist liegen die Konzentrationsbereich von MCP-1 und IL-8 deutlich über denen von GM-CSF und IP-10. In Abb. 3.4 (B) zeigte sich für Roflumilast ein ähnliches Bild. Die GM-CSF und IP-10 Sekretion konnte durch Roflumilast in der Konzentration von 10 μ M signifikant gehemmt werden. Bei MCP-1 zeigte sich im Vergleich zu Apremilast keine Reduktion. Die Sekretion von IL-8 wurde durch Roflumilast, ebenfalls wie bei Apremilast, nicht gehemmt.

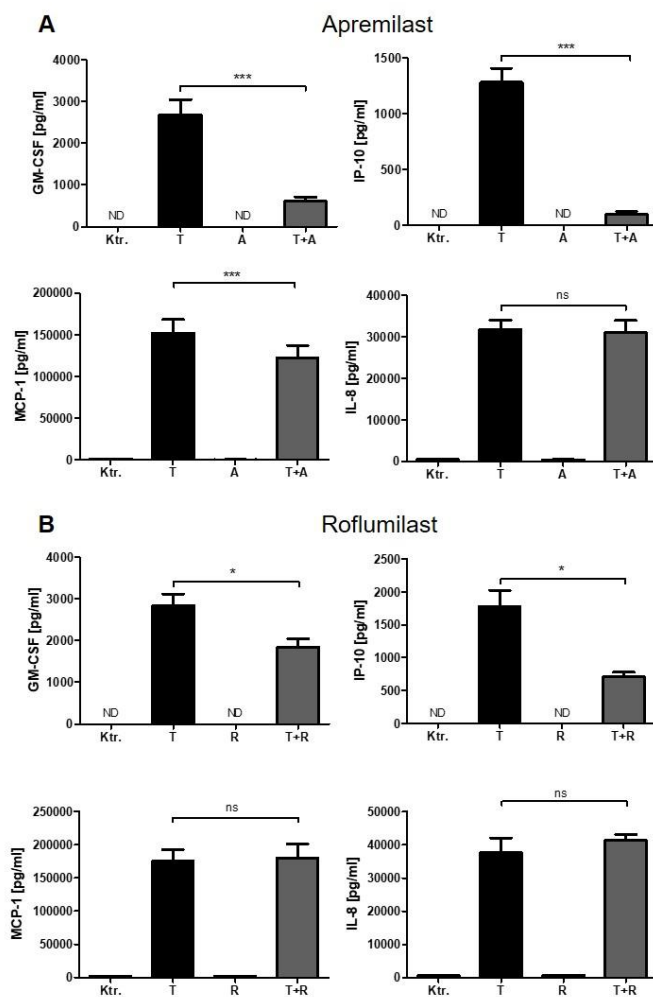


Abb. 3.4: Apremilast und Roflumilast inhibieren die Sekretion von GM-CSF, IP-10, MCP-1 in TNF α -stimulierten HUVEC. Die HUVEC wurden für 24 Stunden mit der Lösungsmittelkontrolle, TNF α (20 ng/ml) alleine, oder TNF α (20 ng/ml) in Kombination mit Apremilast (40 μ M) oder Roflumilast (20 μ M) behandelt. Die gewonnenen Überstände wurden dann mittels des ELISA-Verfahrens untersucht. Zu den untersuchten Zytokinen gehören GM-CSF, IP-10, MCP-1 und IL-8. Die Konzentrationen sind in pg/ml angegeben. Die Mittelwerte werden dargestellt \pm SEM. *** P<0,001; ** P<0,01; * P<0,05; ns>0,05 versus TNF α (n=5). Lösungsmittelkontrolle (Ktr.), TNF α (T), Apremilast (A), Roflumilast (R), TNF α + Apremilast (T+A), TNF α + Roflumilast (T+R), nicht detektierbar (ND).

Konzentrationsabhängige Sekretion von GM-CSF

Im zweiten Teil sollte für Apremilast und Roflumilast untersucht werden, ob konzentrationsabhängige Effekte vermittelt werden. Dafür wurde das relevante, proatherogen wirkende Zytokin GM-CSF ausgewählt, welches mittels ELISA-Verfahren gemessen wurde. In Abb. 3.5 (A u B) ist wie beim ersten ELISA-Versuch erkennbar, dass unter der Lösungsmittelkontrolle keine Konzentration gemessen werden konnte und die TNF α -Stimulation zu einem signifikanten Anstieg der Sekretion führte. In Abb. 3.5 (A) zeigt sich unter Apremilast in den angegebenen Konzentrationen, eine signifikante, konzentrationsabhängige Reduktion der GM-CSF-Sekretion. Gleiches ist für Roflumilast in Abb. 3.5 (B) zu beobachten, wenn auch schwächer ausgeprägt als unter Apremilast. Beide zeigen schon unter ihrer niedrigsten eingesetzten Konzentration signifikante Effekte auf die TNF α -induzierte Sekretion von GM-CSF. Apremilast und Roflumilast hemmen somit konzentrationsabhängig die TNF α -induzierte Sekretion von GM-CSF.

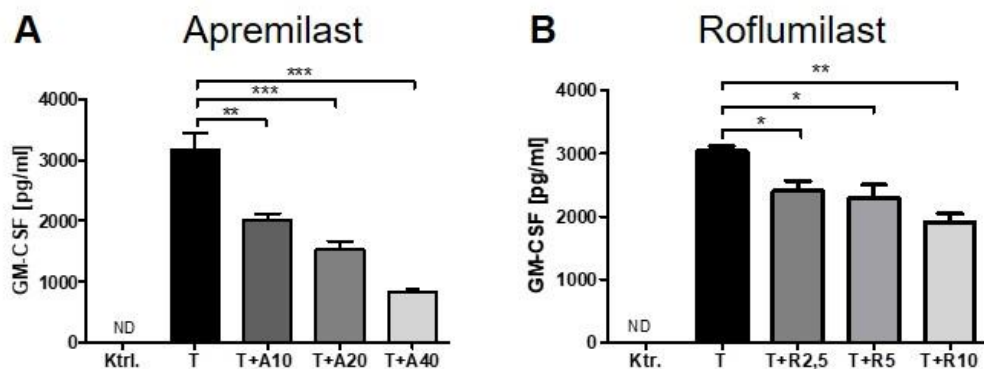


Abb. 3.5: Apremilast und Roflumilast inhibieren konzentrationsabhängig die GM-CSF-Sekretion in TNF α -stimulierten in HUVEC. Die HUVEC wurden für 24 Stunden mit der Lösungsmittelkontrolle, TNF α (20 ng/ml) alleine, oder TNF α (20 ng/ml) in Kombination mit Apremilast (A) oder Roflumilast (B) in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Für Apremilast wurden die Konzentrationen 10 μ M, 20 μ M und 40 μ M, und für Roflumilast 2,5 μ M, 5 μ M und 10 μ M verwendet. Dargestellt sind die Konzentrationen in pg/ml. Die Mittelwerte werden dargestellt \pm SEM. *** P < 0,001; ** P < 0,01; * P < 0,05; ns > 0,05 versus TNF α (n=5). Lösungsmittelkontrolle (Ktrl.), TNF α (T), TNF α +Apremilast in verschiedenen Konzentrationen in μ M (T+A), TNF α +Roflumilast in verschiedenen Konzentrationen in μ M (T+R), nicht detektierbar (ND).

Zeitabhängige Sekretion von GM-CSF

Im dritten Teil wurde untersucht, ob Apremilast auch bei früheren Zeitpunkten einen hemmenden Effekt auf die Sekretion von GM-CSF besitzt. In Abb. 3.6 sind die angegebenen Zeitfenster und Bedingungen dargestellt. Zum Zeitpunkt 0 Stunden ist

weder unter Lösungsmittelkontrolle, noch unter TNF α alleine oder in Kombination mit Apremilast eine Konzentration messbar. Allgemein ist erkennbar, dass ab 3 Stunden die GM-CSF-Sekretion unter TNF α bis 24 Stunden stetig zunimmt. Die Behandlung mit Apremilast führte schon zum Zeitpunkt 3 Stunden zu einer signifikanten Abnahme der TNF α -induzierten GM-CSF-Sekretion. Dies ist auch bei den anderen Zeitpunkten, 6, 9 und 24 Stunden zu beobachten. Apremilast hemmt somit zeitabhängig nach 3, 6, 9 und 24 Stunden die TNF α -induzierte Sekretion von GM-CSF.

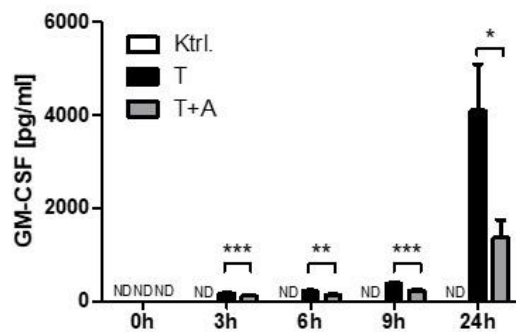


Abb. 3.6: Apremilast inhibiert zeitabhängig die TNF α -induzierte GM-CSF-Sekretion in HUVEC. Die HUVEC wurden für 0, 3, 6, 9 oder 24 Stunden mit der Lösungsmittelkontrolle, TNF α (20 ng/ml) alleine, oder TNF α (20 ng/ml) in Kombination mit Apremilast (40 μ M) behandelt. Dargestellt sind die Konzentrationen in pg/ml. Die Mittelwerte werden dargestellt \pm SEM. *** P<0,001; ** P<0,01; * P<0,05; ns>0,05 versus TNF α (n=6). Lösungsmittelkontrolle (Ktrl.), TNF α (T), TNF α +Apremilast (T+A), nicht detektierbar (ND), Behandlungsdauer in Stunden (h).

3.3 Effekte von Apremilast auf die TNF α -induzierte GM-CSF mRNA-Expression in humanen Endothelzellen

Um herauszufinden ob Apremilast auch auf der transkriptionellen Ebene, einen inhibierenden Einfluss auf GM-CSF besitzt, wurde eine Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) mit anschließender kapillärer Gelelektrophorese durchgeführt. Hierbei sollte die konzentrations- und zeitabhängige Regulierung der Transkription des GM-CSF-Gens untersucht werden. In den Abb. 3.7 und 3.8 sieht man jeweils in Teil A die mRNA-Level von GM-CSF normalisiert auf β -Aktin (Quotient) in Diagrammen mit statistischer Auswertung. In Teil B sind zur Veranschaulichung repräsentative Abbildungen der Konzentrations- und Zeitreihe mit Banden aus der kapillären Gelelektrophorese dargestellt.

Konzentrationsabhängige GM-CSF mRNA-Expression

In Abb. 3.7 (A) der Konzentrationsreihe ist zu erkennen, dass unter der Lösungsmittelkontrolle kaum GM-CSF mRNA gebildet wurde, diese aber durch Stimulation mit TNF α nach 24 Stunden deutlich anstieg. In einer Konzentration von 10 μ M konnte Apremilast die TNF α -induzierte Transkription von GM-CSF nicht signifikant inhibieren. Jedoch gelang dies in den Konzentrationen 20 μ M und 40 μ M. Dies ist ebenfalls in Abb. 3.7 (B) repräsentativ dargestellt. Apremilast inhibiert somit konzentrationsabhängig mit 20 und 40 μ M die TNF α -induzierte Transkription von GM-CSF.

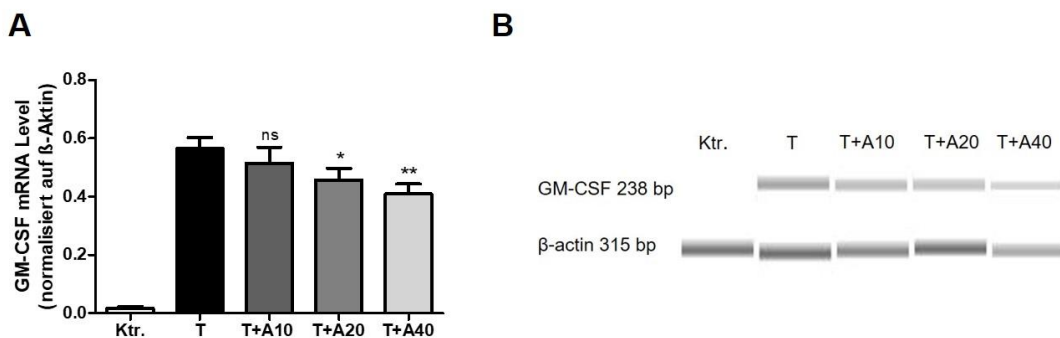


Abb. 3.7: Apremilast inhibiert konzentrationsabhängig die TNF α -stimulierte GM-CSF-Transkription in HUVEC. (A) Diagramm mit statistischer Auswertung der GM-CSF mRNA-Expression normalisiert auf β -Aktin und (B) repräsentative Darstellung der kapillären Gelelektrophorese. Die HUVEC wurden für 24 Stunden mit der Lösungsmittelkontrolle, TNF α (20 ng/ml) alleine, oder mit TNF α (20 ng/ml) in Kombination mit Apremilast in den Konzentrationen 10 μ M, 20 μ M und 40 μ M behandelt. Danach wurde die mRNA gewonnen und mittels eines Thermozyklers auf cDNA umgeschrieben und amplifiziert. Die Konzentrationen wurden durch kapilläre Gelelektrophorese (Qiaxcel Advanced) bestimmt. Die Mittelwerte werden dargestellt \pm SEM. *** P<0,001; ** P<0,01; * P<0,05; ns>0,05 versus TNF α (n=5). Lösungsmittelkontrolle (Ktrl.), TNF α (T), TNF α +Apremilast in verschiedenen Konzentrationen in μ M (T+A).

Zeitabhängige GM-CSF mRNA-Expression

Für die Zeitabhängigkeit wurden die Zeitpunkte wie bei der zeitabhängigen GM-CSF-Sekretion (0, 3, 6, 9 oder 24 Stunden) gewählt. In Abb. 3.8 (A) ist zu sehen, dass in den unstimulierten Zellen (Zeitpunkt 0 Stunden) keine relevante mRNA-Bildung unter allen Bedingungen gemessen wurde. Allgemein ist zu sehen, dass mit zunehmender Behandlungsdauer ab 3 Stunden die mRNA-Bildung unter TNF α stetig zunimmt. In Kombination mit Apremilast in der Konzentration 40 μ M ist in allen angegebenen Zeitpunkten von 3 bis 24 Stunden eine signifikante Reduktion der GM-CSF mRNA-Expression zu beobachten. Am signifikantesten ist dies zum Zeitpunkt 3 Stunden. Sichtbar sind diese Unterschiede auch in den dargestellten Banden in der Abb. 3.8 (B).

Apremilast hemmt somit zeitabhängig nach 3, 6, 9 und 24 Stunden die TNF α -induzierte Transkription von GM-CSF.

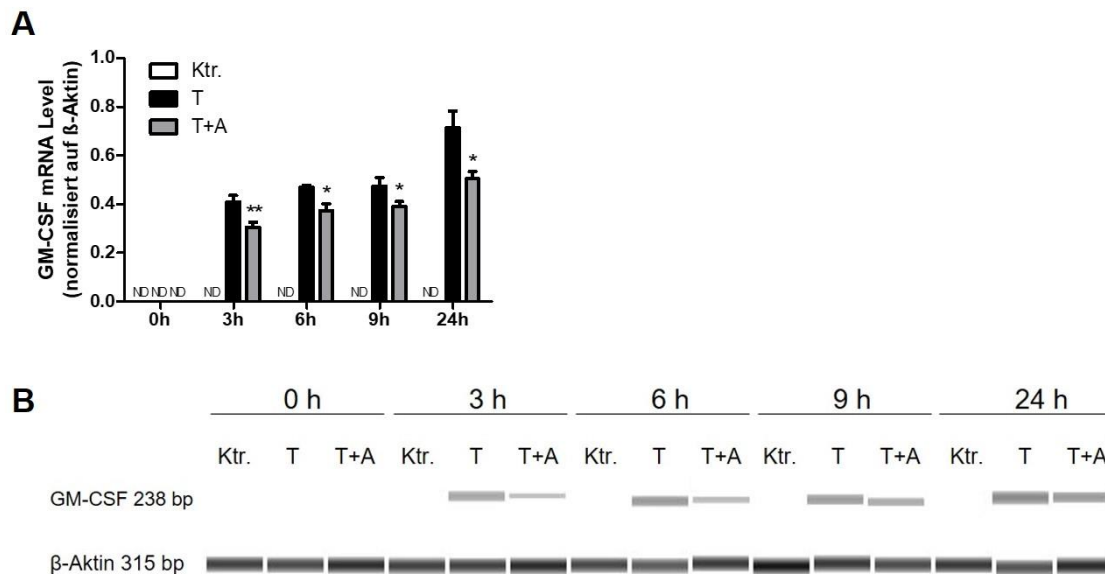


Abb. 3.8: Apremilast inhibiert zeitabhängig die TNF α -stimulierte GM-CSF-Transkription in HUVEC. (A) Diagramm mit statistischer Auswertung der GM-CSF mRNA-Expression normalisiert auf β -Aktin und (B) repräsentative Darstellung der kapillären Gelelektrophorese. Die HUVEC wurden für 0, 3, 6, 9 oder 24 Stunden mit der Lösungsmittelkontrolle, TNF α (20 ng/ml) alleine, oder TNF α (20 ng/ml) in Kombination mit Apremilast (40 μ M) behandelt. Danach wurde die mRNA gewonnen und mittels eines Thermozyklers auf cDNA umgeschrieben und amplifiziert. Die Konzentrationen wurden durch kapilläre Gelelektrophorese (Qiaxcel Advanced) bestimmt. Die Mittelwerte werden dargestellt \pm SEM. *** P<0,001; ** P<0,01; * P<0,05; ns>0,05 versus TNF α (n=5). Kontrolle (Ktrl.), TNF α (T), TNF α +Apremilast (T+A), nicht detektierbar (ND) Behandlungsdauer in Stunden (h).

3.4 Wirkung von Apremilast auf die TNF α -induzierte Expression endothelialer Adhäsionsrezeptoren

Es ist bekannt, dass bei entzündlicher Aktivierung von Endothelzellen, unter anderem durch TNF α über den NF- κ B-Signalweg, Adhäsionsrezeptoren wie VCAM-1, ICAM-1 und E-Selektin vermehrt exprimiert werden (Chang et al. 2014; Wang et al. 2016). Sie bilden die Grundlage für die Adhäsion von Leukozyten an die Endothelzellen. Im weiterführenden Schritt der Migration sind u.a. auch JAM-A und PECAM-1 beteiligt (Albelda et al. 1991; Ostermann et al. 2002; Harry et al. 2008). Zur Wirkung von Apremilast auf diese Prozesse ist wenig bekannt. Es konnte bisher nur gezeigt werden, dass es die oxLDL-induzierte Expression von VCAM-1 auf Endothelzellen hemmt (Wang et al. 2020). In Teil A der Abb. 3.9 ist jeweils für die einzelnen Adhäsionsrezeptoren eine repräsentative Westernblot-Abbildung und in Teil B die jeweiligen Diagramme mit

densitometrischer Ausmessung und statistischer Auswertung mehrerer Experimente dargestellt. Die Diagramme sind in Prozent von der TNF α -Behandlung (=100%) dargestellt. In den abgebildeten repräsentativen Westernblots ist bereits deutlich zu erkennen, dass es unter TNF α zu einer verstärkten Bildung von VCAM-1, ICAM-1 und E-Selektin im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle kommt. Dies bestätigt sich in den densitometrischen Auswertungen. Bei den Adhäsionsrezeptoren PECAM-1 und JAM-A konnte jedoch durch TNF α -Stimulation keine Veränderung gemessen werden. Bei der Kombination von Apremilast und TNF α wurde bei VCAM-1 und E-Selektin eine signifikante Reduktion der Expression beobachtet. Auch ist ersichtlich, dass die Behandlung mit 40 μ M Apremilast einen stärkeren Effekt besitzt gegenüber der Behandlung mit 20 μ M. Im Gegensatz zu VCAM-1 und E-Selektin B führte die Zugabe von Apremilast in beiden Konzentrationen zu einer verstärkten Expression von ICAM-1, welche sich jedoch rechnerisch nicht signifikant darstellte. Für PECAM-1 und JAM-A konnte mit Apremilast keine Veränderung im Vergleich zur Kontrolle und zur alleinigen TNF α -Behandlung beobachtet werden. Apremilast hemmt somit die TNF α -induzierte Expression von VCAM-1 und E-Selektin in HUVEC.

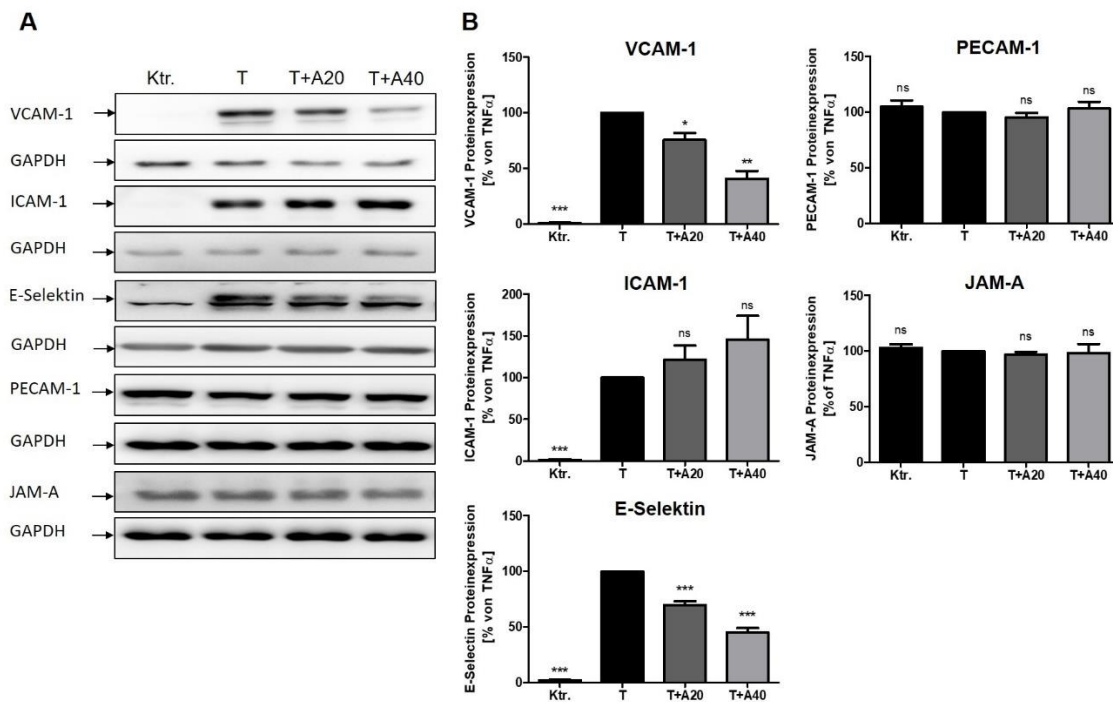


Abb. 3.9: Apremilast inhibiert die Expression von VCAM-1 und E-Selektin in TNF α -aktivierten HUVEC. (A) Repräsentative Westernblots von VCAM-1, ICAM-1, E-Selektin, PECAM-1 und JAM-A sowie GAPDH und (B) die jeweiligen Diagramme mit statistischer Auswertung nach densitometrischer Bestimmung der Proteinexpression und Ladungsabgleich mit GAPDH. Dargestellt sind die prozentualen Werte ausgehend von TNF α (= 100%). Die HUVEC wurden für 24 Stunden mit der Lösungsmittelkontrolle, TNF α (20 ng/ml), TNF α (20 ng/ml) + Apremilast (20 μ M und 40 μ M) behandelt. Das Gesamtprotein wurde isoliert, die Konzentration bestimmt und 15 μ g Protein pro Bedingung im Western blot eingesetzt. Die TNF α -Behandlung

wurde für jedes Experiment auf 100% gesetzt. Die Mittelwerte werden dargestellt \pm SEM. *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$; ns $> 0,05$ versus TNF α (n=5). Lösungsmittelkontrolle (Ktr.), TNF α (T), TNF α +Apremilast in verschiedenen Konzentrationen in μ M (T+A).

3.5 Wirkung von Apremilast auf die TNF α -induzierte Aktivierung der MAPK-Signalwege

3.5.1 Effekte auf die MAPK JNK 1/2, ERK 1/2 und p38

Wie in Kapitel 1.1.3.6 erwähnt, haben die MAPK unter anderem bei entzündlichen Geschehen eine essentielle Bedeutung (Cargnello und Roux 2011; Sun et al. 2015). Aus diesem Grund wurde die Aktivierung der einzelnen MAPK, sprich die Phosphorylierung, analysiert. In Teil A der Abb. 3.10 ist jeweils für JNK 1/2, ERK 1/2 und p38, deren phosphorylierte und unphosphorylierte Form in einer repräsentativen Westernblot-Abbildung und in Teil B die jeweiligen Diagramme mit densitometrischer Ausmessung und statistischer Auswertung mehrerer Experimente dargestellt. Zunächst ist in beiden Teilen für alle MAPK zu erkennen, dass TNF α nach 10 Minuten zur stärksten Phosphorylierung führt. Jedoch ist diese bei ERK 1/2 deutlich schwächer ausgeprägt als bei JNK1/2 und p38. Betrachtet man die densitometrische Ausmessung (Abb 3.10 B) für die MAPK JNK 1/2 fällt auf, dass durch die Behandlung mit Apremilast die TNF α -induzierte Phosphorylierung schon ab einem Zeitpunkt von 5 Minuten zu einer signifikanten Inhibition führt. Dies zeigt sich auch nach 10 Minuten und 30 Minuten. Im Gegensatz dazu führt die zusätzliche Behandlung mit Apremilast bei ERK 1/2 zu keiner Reduktion der TNF α -induzierten Phosphorylierung. Bei p38 wiederum kommt es nach 10 min durch Apremilast zu einer nicht signifikanten Reduktion, welche jedoch nach 30 und 60 Minuten signifikant wird. Diese Unterschiede sind auch deutlich in den dargestellten, repräsentativen Western Blots in Abb. 3.10 (A) zu erkennen.

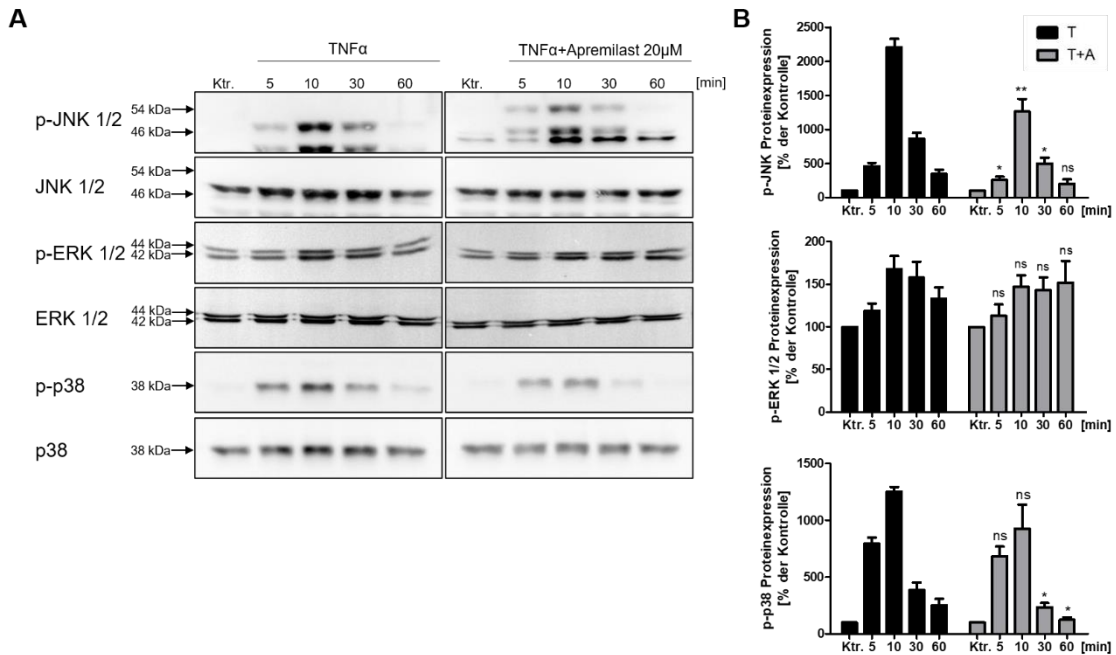


Abb. 3.10: Apremilast inhibiert die TNF α -induzierte Phosphorylierung der MAPK JNK1/2 und p38 in HUVEC. (A) Repräsentativer Western blot von JNK1/2, ERK 1/2, p38 phosphoryliert und unphosphoryliert mit der jeweiligen Behandlungsdauer und den Behandlungssubstanzen und (B) die jeweiligen Diagramme mit statistischer Auswertung nach densitometrischer Bestimmung der Proteinexpression der phosphorylierten MAPK normalisiert auf den unphosphorylierten Zustand. Dargestellt sind die prozentualen Werte ausgehend von der Kontrolle (=100%). Die HUVEC wurden für 5, 10, 30 und 60 Minuten mit TNF α (20 ng/ml) oder mit TNF α (20 ng/ml) + Apremilast (20 μ M) behandelt. Das Gesamtprotein wurde isoliert, die Konzentration bestimmt und 15 μ g Protein pro Bedingung im Western blot eingesetzt. Die Mittelwerte werden dargestellt \pm SEM. *** P<0,001; ** P<0,01; * P<0,05; ns>0,05 versus TNF α (n=6).

3.5.2 Einfluss der verschiedenen MAPK-Signalwege auf die GM-CSF-Sekretion in aktivierten Endothelzellen

Im Zusammenhang mit den von Apremilast inhibierten MAPK in TNF α -stimulierten HUVEC sollte im nächsten Schritt weiter untersucht werden, wie sich die Inhibition der einzelnen MAPK mit spezifischen Inhibitoren, auf die GM-CSF-Sekretion von Endothelzellen auswirkt. Dazu wurden die spezifischen MAPK-Inhibitoren SP600125 (JNK1/2-Inhibitor), U0126 (MEK1/2-Inhibitor bzw. ERK 1/2) und SB203580 (p38-Inhibitor) verwendet. In Abb. 3.11 ist zunächst zu erkennen, dass TNF α , wie bei den vorherigen Versuchen zur GM-CSF-Sekretion, zu einem Anstieg der Sekretion im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle führte. Interessanterweise führte die Zugabe der spezifischen Inhibitoren von JNK 1/2 und p38 zu einer signifikanten Reduktion der GM-CSF-Sekretion. Die gleichen MAPK die Apremilast in ihrer Aktivierung hemmen konnte. Lediglich die Inhibition von ERK 1/2 führte zu keiner eindeutigen Inhibition der Sekretion.

Die alleinige Applikation aller MAPK-Inhibitoren, ohne Zusatz von TNF α , führte zu keinem Anstieg der GM-CSF Sekretion. Gleiches gilt für die Lösungsmittelkontrolle.

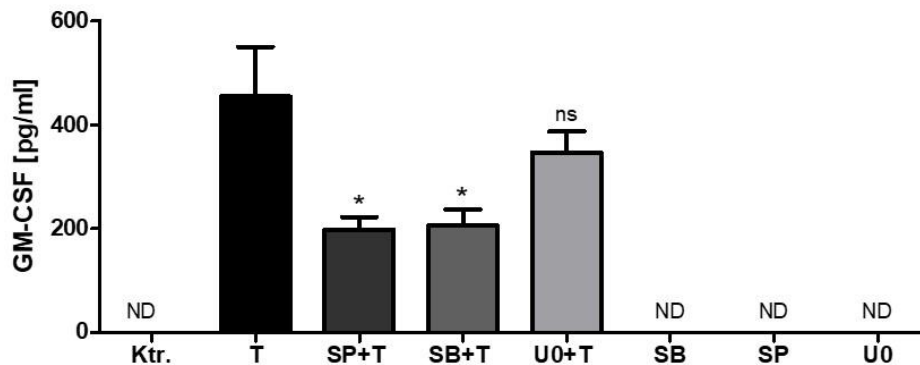


Abb. 3.11: Effekt von MAPK-Inhibitoren auf die TNF α -induzierte GM-CSF Sekretion in HUVEC. Die HUVEC wurden 30 Minuten mit der Lösungsmittelkontrolle, SP600125 (10 μ M), SB203580 (10 μ M) oder U0126 (10 μ M) vorbehandelt. Danach wurde dem Medium entweder Lösungsmittel für TNF α oder TNF α (Endkonzentration: 20 ng/ml) für 10 Stunden hinzugegeben. Die gewonnenen Überstände wurden dann mittels ELISA-Verfahren ausgewertet. Dargestellt sind die Konzentrationen in pg/ml. Die Mittelwerte werden dargestellt \pm SEM *** P<0,001; ** P<0,01; * P<0,05; ns>0,05 versus TNF α (n=5). Lösungsmittelkontrolle (Ktr.), TNF α (T), SP = SP600125 (SP), SB203580 (SB), U0126 (U0), nicht detektierbar (ND).

3.5.3 Wirkung verschiedener MAPK-Inhibitoren auf die Expression endothelialer Adhäsionsrezeptoren

Nachdem überprüft wurde, wie sich Apremilast auf die TNF α -induzierte Expression der Adhäsionsrezeptoren verhält, sollte nun untersucht werden welchen Einfluss die MAPK-Inhibitoren SP600125 (JNK1/2), SB203580 (p38), U0126 (MEK 1/2 bzw. ERK1/2) und der NF- κ B-inhibitor Resveratrol auf die Expression haben. In Teil A und B der Abb. 3.12 ist zu sehen, dass die TNF α -Behandlung zu einer verstärkten Expression aller Adhäsionsrezeptoren führt. Betrachtet man in Teil B die statistische Auswertung, fällt für VCAM-1 zunächst auf, dass lediglich die Inhibition von p38 (SB203580) zu einer signifikanten, reduzierten Expression führt. Unter der JNK1/2-Inhibition (SP600125) kam es sogar zu einem signifikanten Anstieg der Expression von VCAM-1. Durch die Hemmung von ERK 1/2 bzw. MEK 1/2 (U0126) und NF- κ B mit Resveratrol kam es zu keiner signifikanten Veränderung. Bei ICAM-1 führte die Hemmung von p38 und NF- κ B (Resveratrol) in den TNF α -stimulierten HUVEC zu einer signifikant reduzierten Expression, wohingegen die Inhibition von JNK1/2 und ERK 1/2 keine Veränderung zeigte. Für E-Selektin zeigt sich nochmal ein anderes Bild. Die Hemmung von JNK 1/2

und p38 konnte die TNF α -induzierte Expression signifikant reduzieren. Bei der Inhibition von ERK 1/2 kam es sogar zu einem Anstieg der E-Selektin-Bildung. Unter Resveratrol zeigte sich hier keine Veränderung. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tab 3.1 aufgeführt.

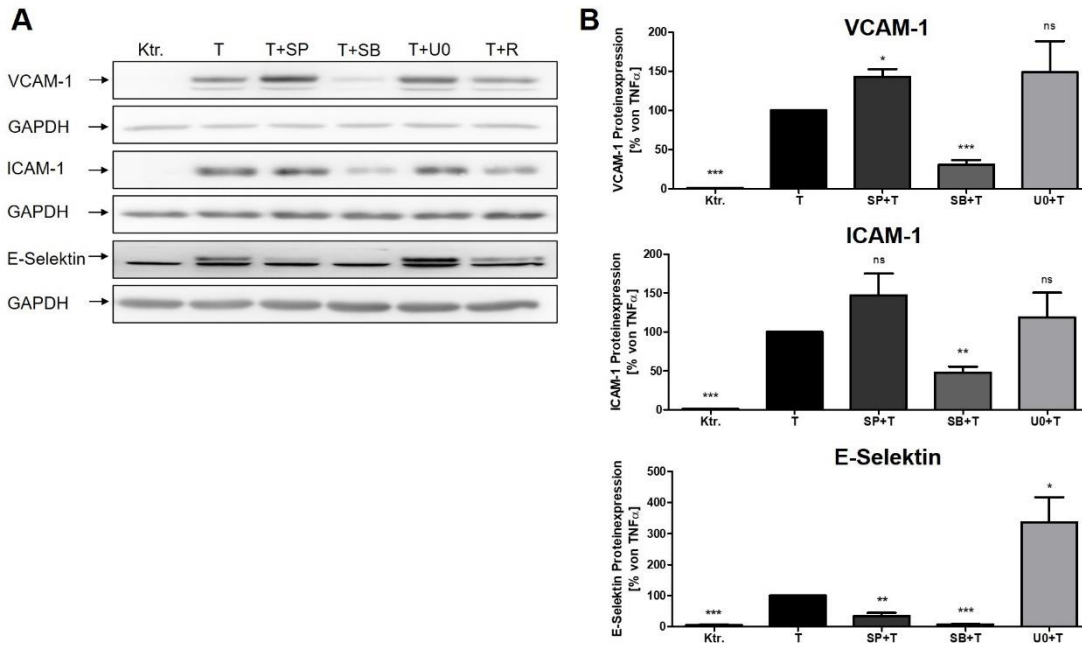


Abb. 3.12 Effekt von MAPK-Inhibitoren auf die TNF α -induzierte Expression endothelialer Adhäsionsrezeptoren in HUVEC. (A) Repräsentative Westernblots von VCAM-1, ICAM-1, E-Selektin sowie GAPDH und (B) die jeweiligen Diagramme mit statistischer Auswertung nach densitometrischer Bestimmung der Proteinexpression nach Ladungsabgleich mit GAPDH. Dargestellt sind die prozentualen Werte ausgehend von TNF α (= 100%). Die HUVEC wurden 30 min mit der Lösungsmittelkontrolle, SP600125 (10 μ M, Inhibitor JNK 1/2), SB203580 (10 μ M, Inhibitor p38), U0126 (10 μ M, Inhibitor MEK 1/2 bzw. ERK 1/2) vorbehandelt. Danach wurde dem Medium entweder Lösungsmittel für TNF α oder TNF α (Endkonzentration: 20 ng/ml) für 24 Stunden hinzugegeben. Die Mittelwerte werden dargestellt \pm SEM. *** P<0,001; ** P<0,01; * P<0,05; ns>0,05 versus TNF α (n=5). Lösungsmittelkontrolle (Ktr.), TNF α (T), SP = SP600125 (SP), SB203580 (SB), U0126 (U0).

Inhibition von / Adhäsionsrezeptoren	JNK1/2 (SP600125)	p38 (SB203580)	MEK 1/2 ERK1/2 (U0126)
VCAM-1	↑	↓	↔
ICAM-1	↔	↓	↔
E-Selektin	↓	↓	↑

Tab. 3.1: Übersicht zum Effekt von MAPK-Inhibitoren auf die TNF α -induzierte Expression endothelialer Adhäsionsrezeptoren in HUVEC.

3.6 Wirkung von Apremilast auf die TNF α -induzierte Aktivierung des NF- κ B Signalweges

Ein weiterer Signalweg, welcher bei der entzündlichen Aktivierung von Endothelzellen eine entscheidende Rolle spielt ist der NF- κ B-Signalweg. Dieser wird unter anderem durch TNF α aktiviert und ist an der Entstehung der Atherosklerose beteiligt (Gareus et al. 2008; Pan et al. 2016). NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, welcher aus verschiedenen Untereinheiten besteht. Die Untereinheit p65 ist die relevante, weshalb diese untersucht wurde. Dafür sollte zunächst der Effekt von Apremilast auf die TNF α -induzierte Phosphorylierung bzw. Aktivierung von p65 im Gesamtprotein untersucht werden. Im nächsten Schritt lag die Betrachtung auf der Translokation von p65 in den Nucleus. Da die Translokation und Aktivierung von NF- κ B über die Hemmung von I κ B α wirkt, sollte dieser im zytoplasmatischen Protein mitunter untersucht werden (Denk et al. 2001; Schmid und Birbach 2008). Zur Veranschaulichung der Translokation wurde außerdem eine Fluoreszenzfärbung von p65 angefertigt, um die nukleäre Translokation von p65 unter TNF α allein bzw. in Kombination mit Apremilast optisch darzustellen.

3.6.1 p65-Phosphorylierung im Gesamtprotein

Die Behandlung der Zellen und Auswertung der Ergebnisse erfolgte wie in Kap 3.6.1 (MAPK) beschrieben. Im Teil A der Abb. 3.13 ist für p65, dessen phosphorylierte und unphosphorylierte Form in einer repräsentativen Westernblot-Abbildung und in Teil B das Diagramm mit densitometrischer Ausmessung und statistischer Auswertung mehrerer Experimente dargestellt. Auch hier ist zu sehen, dass die Phosphorylierung vor früh nach Behandlung abläuft. Nach 5 bzw. 10 Minuten ist die maximale Phosphorylierung unter TNF α erreicht. Die Zugabe von Apremilast (20 μ M) konnte nach 5, 10 und 30 Minuten zu keiner signifikanten Reduktion der Phosphorylierung führen. Erst nach 60 Minuten, kam es unter Apremilast zu einer signifikant verminderten Phosphorylierung von p65.

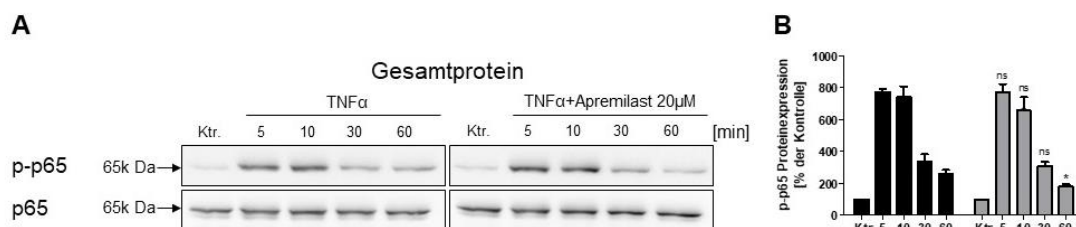


Abb. 3.13: Apremilast inhibiert langsam die TNF α -induzierte Phosphorylierung von p65 in HUVEC. (A) Repräsentativer Westernblot von p65 phosphoryliert und unphosphoryliert mit der jeweiligen Behandlungsdauer und den Behandlungssubstanzen und (B) das dazugehörige Diagramm mit statistischer

Auswertung nach densitometrischer Bestimmung der Proteinexpression des phosphorylierten p65 normalisiert auf den unphosphorylierten Zustand. Dargestellt sind die prozentualen Werte ausgehend von der Kontrolle (=100%). Die HUVEC wurden für 5, 10, 30 und 60 Minuten mit TNF α (20 ng/ml) oder mit TNF α (20 ng/ml) + Apremilast (20 μ M) behandelt. Das Gesamtprotein wurde isoliert, die Konzentration bestimmt, und 15 μ g Protein pro Bedingung im Western blot eingesetzt. Die Mittelwerte werden dargestellt \pm SEM. *** P<0,001; ** P<0,01; * P<0,05; ns>0,05 versus TNF α (n=6).

3.6.2 p65 im nukleären und I κ B α im zytosolischen Protein

Das nächste Experiment um den NF- κ B -Signalweg genauer zu untersuchen, ist die Analyse der Translokation von p65 in den Nucleus. I κ B α ist entscheidend daran beteiligt, den Eintritt von p65 in den Kern zu inhibieren, indem es p65 im Zytosol bindet (Mulero et al. 2019). TNF α sorgt für eine Inhibition der Inhibition, indem es I κ B α inaktiviert und somit dazu beiträgt, dass die p65-Untereinheit von NF- κ B in den Kern translozieren kann (Brown et al. 1995; Pan et al. 2016). Da I κ B α fast ausschließlich im Zytosol vorliegt und die Translokation von p65 untersucht werden sollte, wurden zytosolische und nukleäre Proteine isoliert. In Abb. 3.14 A und B lässt sich zunächst in der zytosolische Fraktion erkennen, dass in den unbehandelten Zellen (Kontrolle) eine hohe I κ B α -Konzentration vorliegt. Unter der TNF α -Behandlung kommt es bis zum Zeitpunkt 10 Minuten zu einem fast vollständigen verschwinden von I κ B α . Interessanterweise fällt unter Zugabe von Apremilast die Reduktion von I κ B α in den ersten Minuten leicht schwächer aus und ist zum Zeitpunkt 30 und 60 min sogar signifikant geringer. Apremilast verhindert somit die TNF α -induzierte Degradation von I κ B α im Zytosol. Betrachtet man zeitlich passend dazu die nukleäre Konzentration von p65, wird zunächst ersichtlich, dass unter dem unbehandelten Startzeitpunkt kaum p65 im Zellkern vorliegt. Nach 5 Minuten kommt es unter TNF α zu einer vermehrten Ansammlung von p65 im Zellkern, welche bis 10 Minuten stark ansteigt und dann über 30 und 60 Minuten relativ konstant hoch ist. In der Kombination von TNF α mit Apremilast ist erkennbar, dass Apremilast nach 10, 30 und 60 Minuten zu einer signifikant geringeren nukleären Akkumulation von p65 führt. Vergleicht man die zytosolische Fraktion von I κ B α und die nukleäre Fraktion von p65 fällt auf, dass vor allem in den Zeitpunkten wo Apremilast I κ B α stabilisiert, die Translokation von p65 im Zellkern geringer ausfällt.

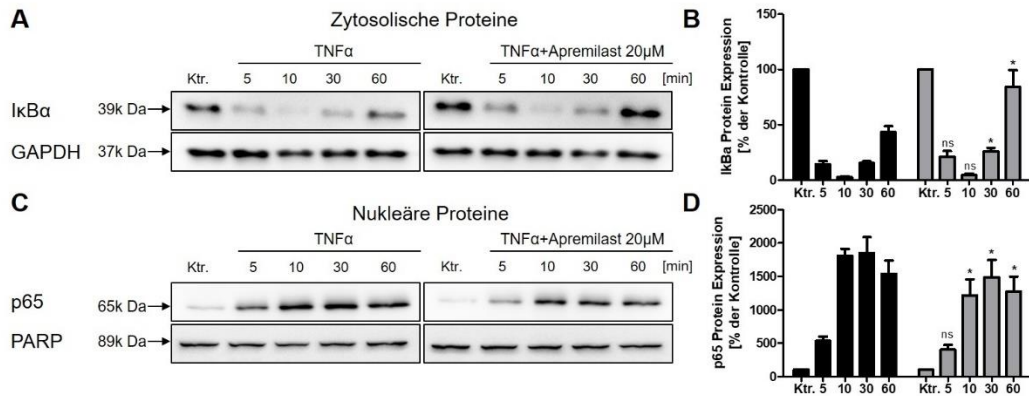


Abb. 3.14: Apremilast inhibiert die p65-Translokation in den Nukleus und stabilisiert IkBα in TNFα-stimulierten HUVEC. (A und C) Repräsentative Westernblots von IkBα und GAPDH sowie p65 und PARP und (B und D) die dazugehörigen Diagramme mit statistischer Auswertung nach densitometrischer Bestimmung der Proteinexpression, normalisiert jeweils auf GAPDH oder PARP. Dargestellt sind die prozentualen Werte ausgehend von der Lösungsmittelkontrolle (=100%). Die HUVEC wurden für 5, 10, 30 und 60 Minuten mit TNFα (20 ng/ml) oder mit TNFα (20 ng/ml) + Apremilast (20 μM) behandelt. Danach wurden die cytosolischen und nukleären Fraktionen isoliert und die Konzentration bestimmt. Für den Western-Blot wurden von den cytosolischen Proteinen 10 μg und von nukleären Proteinen 5 μg eingesetzt. Die Kontrollbehandlung wurde für jedes Experiment auf 100% gesetzt. Die Mittelwerte werden dargestellt ± SEM *** P<0,001; ** P<0,01; * P<0,05; ns>0,05 versus TNFα (n=5).

3.6.3 Nukleärer Nachweis von p65 mittels Immunfluoreszenz

Die Fluoreszenzbilder dienen zum einen der Veranschaulichung der p65-Translokation in den Zellkern und zur Untersuchung eines weiteren Zeitpunktes von 4 Stunden. In Abb. 3.15 sieht man eine repräsentative Immunfluoreszenzfärbung. Diese setzt sich von oben nach unten aus den überlagerten Bildern, der Kernfärbung (blau), der p65-Färbung (rot) und der Zytoskelettfärbung (grün) zusammen. Unter der Behandlung mit der Lösungsmittelkontrolle ist deutlich zu sehen, dass sich kein p65 im Zellkern befindet. Die TNFα-Behandlung führte zu einer stark erhöhten Ansammlung von nukleärem p65. Durch die Zugabe von Apremilast kann die p65-Translokation in den Konzentrationen 20 und 40 μM sichtbar gehemmt werden. Am besten erkenntlich wird dies in der reinen p65-Färbung. Apremilast hemmt somit nach 4 Stunden die TNFα-induzierte p65-Translokation in den Nukleus.

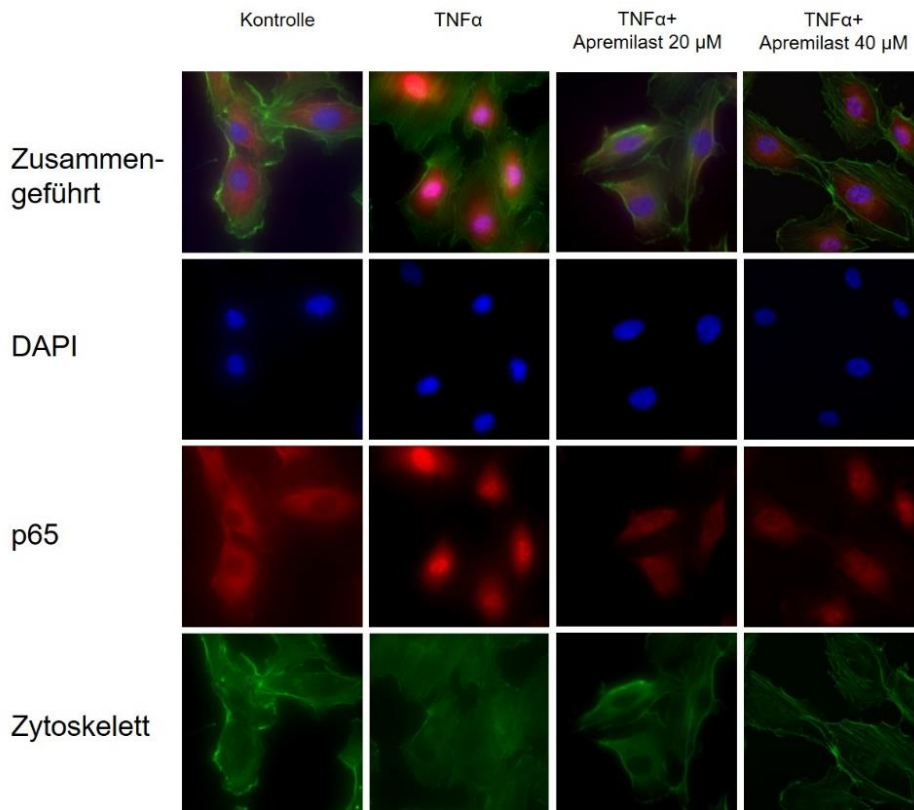


Abb. 3.15: Apremilast inhibiert die TNF α -induzierte p65-Translokation in den Nukleus. Die HUVEC wurden für 4 Stunden mit der Lösungsmittelkontrolle, TNF α (20 ng/ml), TNF α (20 ng/ml) + Apremilast (20 μ M und 40 μ M) behandelt. Anschließend wurde p65, der Zellkern und das Zytoskelett angefärbt und dies mit einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Dargestellt sind Fluoreszenzbilder (n=4).

3.6.4 NF- κ B-Aktivierung

Nach den Untersuchungen zur Phosphorylierung von p65 und Translokation in den Kern, sollte untersucht werden, inwiefern NF- κ B bzw. p65 wirklich aktiviert und somit überhaupt an die DNA binden und als Transkriptionsfaktor für proinflammatorische Gene wirken kann. In der Abb 3.16 ist die NF- κ B-Aktivierung in Prozent von der Lösungsmittelkontrolle (=100%) angegeben. Zunächst kommt es, wie bereits bekannt, unter TNF α -Behandlung zu einer deutlichen Aktivierung von NF- κ B. Die Behandlung mit .Apremilast in den Konzentrationen 20 μ M und 40 μ M konnte diese TNF α -induzierte Aktivierung von NF- κ B signifikant hemmen.

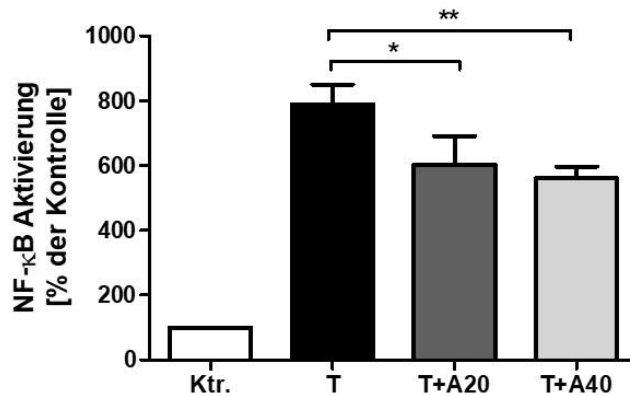


Abb. 3.16: Apremilast inhibiert konzentrationsabhängig die TNF α -stimulierte NF- κ B-Aktivierung in HUVEC. Die HUVEC wurden für 1 Stunde mit der Lösungsmittelkontrolle, TNF α (20 ng/ml) alleine oder TNF α in Kombination mit Apremilast (20 und 40 μ M) behandelt. Die nukleären Proteine wurden geerntet und die NF- κ B-Aktivierung mittels ELISA gemessen. Dargestellt ist die NF- κ B Aktivierung in Prozent von der Lösungsmittelkontrolle (= 100%). Die Mittelwerte werden dargestellt \pm SEM. *** P<0,001; ** P<0,01; * P<0,05; ns>0,05 versus Kontrolle (n=5). Lösungsmittelkontrolle (Ktr.), TNF α (T), TNF α +Apremilast in verschiedenen Konzentrationen in μ M (T+A).

3.6.5 Einfluss eines spezifischen NF- κ B-Inhibitors auf die TNF α -induzierte GM-CSF-Sekretion

Wie bei den MAPK sollte durch spezifische Inhibition von NF- κ B untersucht werden, inwieweit sich diese auf die GM-CSF-Sekretion auswirkt. Dafür wurde Resveratrol verwendet, welches in Endothelzellen NF- κ B inhibiert (Csiszar et al. 2006; Gerhardt et al. 2015). In Abb. 3.17 ist wie in den anderen GM-CSF-Experimenten zu sehen, dass unter der Lösungsmittelkontrolle kein GM-CSF gemessen werden konnte, und es unter TNF α zu einem Anstieg kommt. Durch die Inhibition von NF- κ B mittels Resveratrol wurde die TNF α -induzierte GM-CSF-Sekretion signifikant gehemmt.

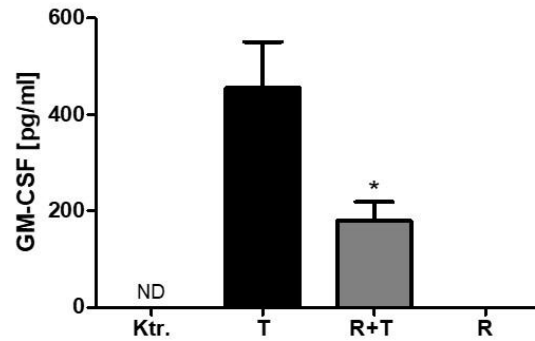


Abb. 3.17: Effekt eines NF- κ B-Inhibitors auf die TNF α -induzierte GM-CSF Sekretion in HUVEC. Die HUVEC wurden 30 Minuten mit der Lösungsmittelkontrolle oder Resveratrol (20 μ M) vorbehandelt. Danach wurde dem Medium entweder Lösungsmittel für TNF α oder TNF α (Endkonzentration: 20 ng/ml) für 10 Stunden hinzugegeben. Die gewonnenen Überstände wurden dann mittels ELISA-Verfahren ausgewertet. Dargestellt sind die Konzentrationen in pg/ml. Die Mittelwerte werden dargestellt \pm SEM *** P<0,001; ** P<0,01; * P<0,05; ns>0,05 versus TNF α (n=5). Lösungsmittelkontrolle (Ktr.), TNF α (T), Resveratrol (R), TNF α +Resveratrol (T+R), nicht detektierbar (ND).

3.6.6 Einfluss eines NF- κ B-inhibitors auf die Expression endothelialer Adhäsionsrezeptoren

Auch für p65 sollte untersucht werden, wie sich die Inhibition von NF- κ B-abhängiger Signalwege mit Resveratrol auf die Expression endothelialer Adhäsionsrezeptoren auswirkt. Die Behandlung erfolgt wie bei den MAPK-Inhibitoren, siehe Kap. 3.6.3. Resveratrol wurde in einer Konzentration von 20 μ M verwendet. Im Teil A der Abb. 3.18 ist jeweils für die einzelnen Adhäsionsrezeptoren eine repräsentative Westernblot-Abbildung und in Teil B die jeweiligen Diagramme mit densitometrischer Ausmessung und statistischer Auswertung mehrerer Experimente dargestellt. Die Diagramme sind in Prozent von der TNF α -Behandlung (=100%) dargestellt. Es zeigt sich, dass durch Resveratrol lediglich die Expression von ICAM-1 gehemmt wird, während auf die anderen endothelialen Adhäsionsrezeptoren sich kein Effekt zeigt.

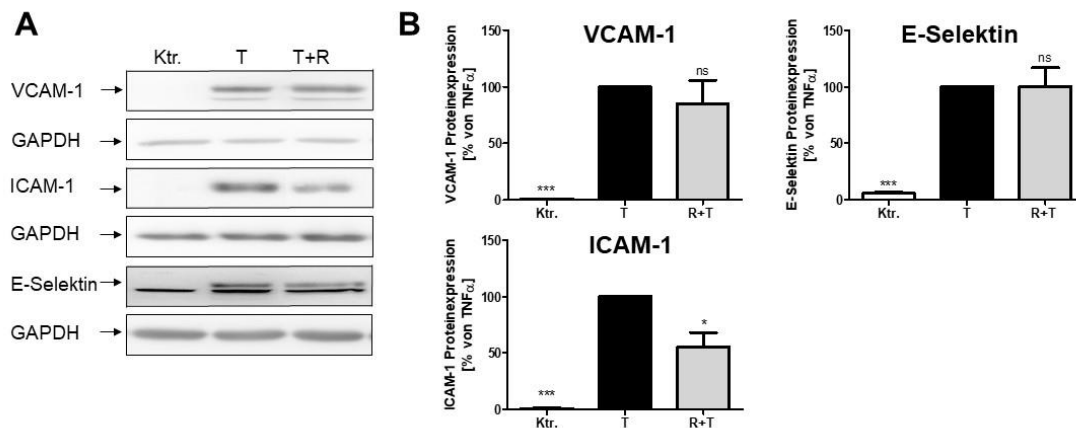


Abb. 3.18 Effekt eines NF- κ B-Inhibitors auf die TNF α -induzierte Expression endothelialer Adhäsionsrezeptoren in HUVEC. (A) Repräsentative Westernblots von VCAM-1, ICAM-1, E-Selektin sowie GAPDH und (B) das jeweilige Diagramm mit statistischer Auswertung nach densitometrischer Bestimmung der Proteinexpression nach Ladungsabgleich mit GAPDH. Dargestellt sind die prozentualen Werte ausgehend von TNF α (= 100%). Die HUVEC wurden 30 min mit der Lösungsmittelkontrolle oder Resveratrol (20 μ M) vorbehandelt. Danach wurde dem Medium entweder Lösungsmittel für TNF α oder TNF α (Endkonzentration: 20 ng/ml) für 24 Stunden hinzugegeben. Die Mittelwerte werden dargestellt \pm SEM. *** P<0,001; ** P<0,01; * P<0,05; ns>0,05 versus TNF α (n=5). Lösungsmittelkontrolle (Ktr.), TNF α (T), Resveratrol (R).

3.7 Funktionelle Untersuchungen mit HUVEC und THP-1 Zellen

3.7.1 Effekt von Apremilast auf die TNF α -induzierte Adhäsion von THP-1-Zellen an HUVEC

Wie in Kap. 3.5 gezeigt führt Apremilast bei TNF α -aktivierten Endothelzellen zu einer Runterregulierung der Expression von VCAM-1 und E-Selektin. Diese beiden Rezeptoren spielen für Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen eine Schlüsselrolle. Aus diesem Grund sollte im nächsten Schritt untersucht werden, inwiefern Apremilast diese Adhäsion inhibieren kann. Dafür wurde eine Endothelzell-Leukozyten-Kokultur verwendet. Für die Gruppe der Leukozyten wurden THP-1-Zellen verwendet. Diese zusammen mit HUVEC sind bei Experimenten zur Untersuchung der Adhäsion und Transmigration ein Standardmodell (Chai et al. 2008; Kim et al. 2010; Wang et al. 2016). In Abb. 3.19 ist klar zu erkennen, dass die TNF α -Behandlung der HUVEC die Adhäsion von THP-1-Zellen, im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle deutlich erhöht. Die Kombination von TNF α und Apremilast führt zu einer signifikanten Senkung der Adhäsion, fast auf das unbehandelte Ausgangsniveau. Auch hier ist ein konzentrationsfähiger Effekt zu erkennen.

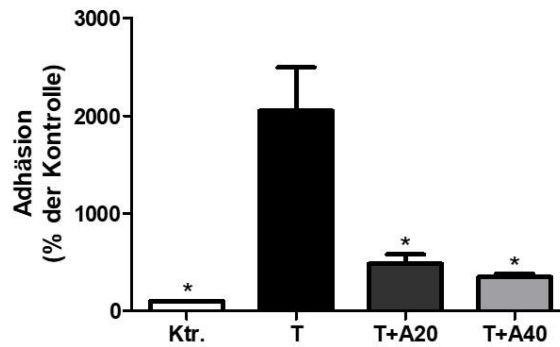


Abb. 3.19: Apremilast inhibiert die TNF α -induzierte Adhäsion von THP-1-Zellen an HUVEC. Die HUVEC wurden für 24 Stunden mit der Lösungsmittelkontrolle, TNF α (20 ng/ml) alleine oder TNF α (20 ng/ml) in Kombination mit Apremilast in den Konzentrationen 20 μ M und 40 μ M behandelt. Die fluoreszenzmarkierten THP-1 Zellen wurden in frischem Medium für 4 Stunden dazugegeben. Die Fluoreszenzintensität der adhärenierten THP-1-Zellen wurde schließlich gemessen. Dargestellt sind die prozentualen Werte ausgehend von Lösungsmittelkontrolle (= 100%). Die Mittelwerte werden dargestellt \pm SEM. * P<0,05; ns>0,05 versus TNF α (n=5). Lösungsmittelkontrolle (Ktr.), TNF α (T), TNF α +Apremilast in verschiedenen Konzentrationen in μ M (T+A).

3.7.2 Effekt von Apremilast auf die TNF α -induzierte Transmigration von THP-1-Zellen durch HUVEC

Die Transmigration stellt den zweiten Schritt bei der Auswanderung von Leukozyten aus dem Intravasalraum dar. Für dieses Experiment wurde ein Ko-Kultur aus HUVEC und THP-1-Zellen, eine monozytäre Zelllinie, verwendet. In Abb. 3.20 ist zu sehen, dass die TNF α -Stimulation der HUVEC zu einer signifikant erhöhten Transmigration der THP-1 Zellen durch die HUVEC-Zellschicht im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle führte. Die durch TNF α -induzierte Transmigration der THP-1-Zellen konnte durch Apremilast signifikant gehemmt werden. Auch hier zeigte sich, wie bei der Adhäsion, eine konzentrationsabhängige Hemmung durch Apremilast.

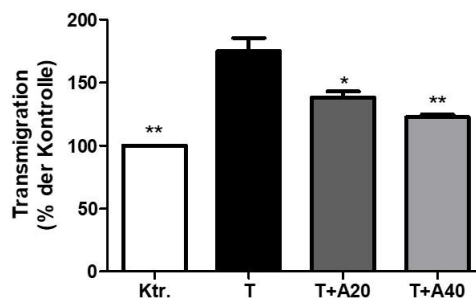


Abb. 3.20: Apremilast inhibiert die TNF α -induzierte Transmigration von THP-1-Zellen durch HUVEC. Die HUVEC wurden in einem Transwellssystem ausgesät und für 24 Stunden mit der Lösungsmittelkontrolle, TNF α (20 ng/ml) alleine oder TNF α (20 ng/ml) in Kombination mit Apremilast in den Konzentrationen 20 μ M und 40 μ M behandelt. Die fluoreszenzmarkierten THP-1 Zellen wurden in frischem Medium für 4 Stunden

auf die HUVEC gegeben. Die Fluoreszenzintensität der migrierten THP-1-Zellen aus der unteren Kammer wurde schließlich gemessen. Dargestellt sind die prozentualen Werte ausgehend von Lösungsmittelkontrolle (= 100%). Die Mittelwerte werden dargestellt \pm SEM. * $P < 0,05$; ns $> 0,05$ versus $\text{TNF}\alpha$ (n=5). Lösungsmittelkontrolle (Ktr.), $\text{TNF}\alpha$ (T), $\text{TNF}\alpha$ +Apremilast in verschiedenen Konzentrationen in μM (T+A).

3.8 Effekt von Apremilast auf die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte MMP 9-Sekretion in THP-1-Zellen

Die Matrixmetalloprotease-9 ist eine Gelatinase, welche unter anderem von Leukozyten ausgeschüttet wird, um einen Weg in das umliegende Gewebe freizulegen. Sie ist aufgrund dieser Fähigkeit auch an der Infiltration von atherosklerotischen Läsionen durch Leukozyten beteiligt und Wanderung von glatten Muskelzellen (Mason et al. 1999; Johnson et al. 2005). Deshalb war es von Interesse herauszufinden, ob Apremilast in der Lage ist die Sekretion der MMP-9 in Leukozyten zu inhibieren. Dafür wurde die THP-1 Zelllinie aus den Adhäsions- und Transmigrationsversuchen verwendet. In Abb. 3.21 ist jeweils die Konzentration der sezernierten MMP-9 unter den verschiedenen Bedingungen zu angegeben. Die $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation führt zu einer signifikanten Freisetzung von MMP-9 gegenüber der Lösungsmittelkontrolle. Diese Freisetzung konnte durch Apremilast konzentrationsabhängig signifikant inhibiert werden.

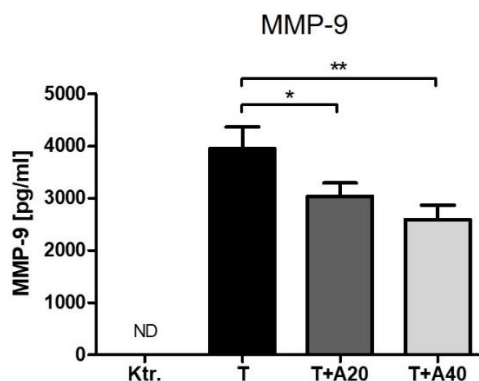


Abb. 3.21: Apremilast inhibiert die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Sekretion von MMP-9 in THP-1-Zellen. Die THP-1 wurden für 24 Stunden mit der Lösungsmittelkontrolle, $\text{TNF}\alpha$ (20 ng/ml) alleine oder mit $\text{TNF}\alpha$ (20 ng/ml) in Kombination mit Apremilast in den Konzentrationen 20 μM und 40 μM behandelt. Die gewonnenen Überstände wurden dann im ELISA aufgetragen und gemessen. Dargestellt sind die Konzentrationen in pg/ml. Die Mittelwerte werden dargestellt \pm SEM. *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$; ns $> 0,05$ versus $\text{TNF}\alpha$ (n=7). Lösungsmittelkontrolle (Ktr.), $\text{TNF}\alpha$ (T), $\text{TNF}\alpha$ +Apremilast in verschiedenen Konzentrationen in μM (T+A), nicht detektierbar (ND).

3.9 Effekt von Apremilast auf die IL-17A-induzierte Sekretion proatherogener Zytokine

Im letzten Experiment wurden die Endothelzellen mit IL-17A aktiviert. IL-17A ist ein Schlüsselzytokin in der Psoriasis vulgaris, aber auch an der Entstehung der Atherosklerose beteiligt. In Abb. 3.22 ist zu sehen, dass unter der Lösungsmittelkontrolle und der Stimulation mit IL-17A lediglich eine messbare Sekretion von IL-6, MCP-1 und IL-8 induziert werden konnte. Bei GM-CSF und IP-10 war keine Sekretion zu messen (Diagramme nicht dargestellt). Bei IL-8 zeigte sich zwar eine Sekretion, welche jedoch unter der Behandlung mit IL-17A zu keinem Anstieg im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle führte, weshalb hier auf die Behandlung mit Apremilast und Roflumilast verzichtet wurde. Für das Zytokin IL-6 zeigte sich, dass Apremilast in allen angegebenen Konzentrationen zu einer signifikanten Reduktion der IL-6-Sekretion führte, wohingegen sich unter der Behandlung mit Roflumilast in den angegebenen Konzentrationen kein Effekt zeigte. Für MCP-1 zeigte sich Ähnliches: Apremilast konnte in den Konzentrationen 20 μM und 40 μM die IL-17A-induzierte Sekretion signifikant inhibieren. Für Roflumilast zeigten sich auch hier keine Effekte.

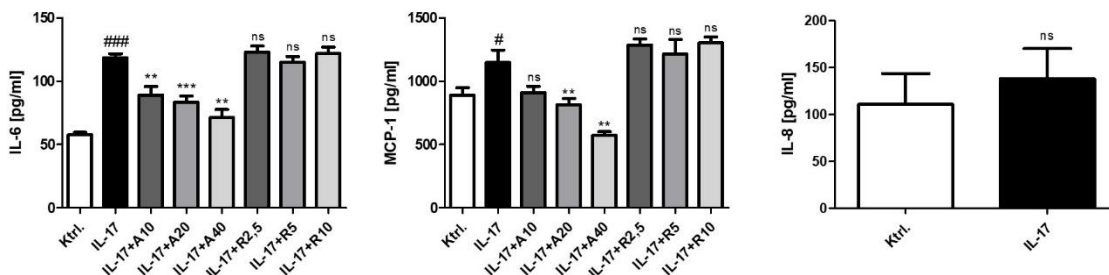


Abb. 3.22: Apremilast inhibiert die IL-17A-induzierte Sekretion von IL-6 und MCP-1 in HUVEC. Die HUVEC wurden für 24 Stunden mit der Kontrolle, IL-17A (100 ng/ml) alleine oder mit IL-17A (100 ng/ml) in Kombination mit Apremilast in den Konzentrationen 10 μM , 20 μM und 40 μM oder Roflumilast in den Konzentrationen 2,5 μM , 5 μM und 10 μM behandelt. Die gewonnenen Überstände wurden dann im ELISA aufgetragen und gemessen. Zu den untersuchten Zytokinen gehören IL-6, MCP-1, IL-8, IP-10 und GM-CSF (IP-10 und GM-CSF nicht dargestellt). Dargestellt sind die Konzentrationen in pg/ml. Die Mittelwerte werden dargestellt \pm SEM. ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$ versus IL-17A ($n=5$). Lösungsmittelkontrolle (Ktrl.), TNF α (T), TNF α +Apremilast in verschiedenen Konzentrationen in μM (T+A), TNF α +Roflumilast in verschiedenen Konzentrationen in μM (T+R), nicht detekierbar (ND).

4 Diskussion

4.1 Einleitung

Ziel der Arbeit war es zu untersuchen wie Apremilast, ein PDE-4-Inhibitor, sich auf entzündlich aktivierte Endothelzellen auswirkt und die molekularen Mechanismen der Apremilast-vermittelten Effekte aufzudecken. Uns interessierten insbesondere durch Endothelzellen sezernierte Zytokine, sowie endotheliale Signalwege und die Interaktionen zwischen Endothelzellen und Monozyten die an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt sind. Erste Hinweise, dass Apremilast sich positiv auf Risikofaktoren der Atherosklerose auswirkt, bot die Phase-III-Zulassungsstudie ESTEEM 1 um Papp und Kollegen. Die mit Apremilast (30 mg zwei Mal pro Tag) behandelten Patienten zeigten eine durchschnittliche Gewichtsreduktion um 2,08 kg, wovon 19% sogar mehr als 5% Gewicht verloren (Papp et al. 2015). Diese Ergebnisse konnten durch Ferguson und Kollegen in einer prospektiven Beobachtungsstudie bei Psoriasis-Arthritis Patienten, welche ebenfalls mit Apremilast behandelt wurden, bestätigt werden. Zusätzlich wurde hier das intraabdominelle Fettgewebe gemessen, welches unter der Therapie ebenfalls signifikant abnahm (Ferguson et al. 2022). In einem Fallbericht von Gualtierotti und De Lucia zeigte sich zusätzlich zu der Verringerung des Gewichts, ein positiver Effekt auf die Serumfettwerte. Es kam zu einer Abnahme von Triglyceriden und LDL, sowie zu einem Anstieg von HDL über den beobachteten Zeitraum von 1, 6 und 12 Monaten (Gualtierotti und Lucia 2019). Wichtige Mechanismen in der Initiation der Atherosklerose sind zum einen die endotheliale Sekretion verschiedener proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, wie GM-CSG und MCP-1, sowie die Ausbildung verschiedener endothelialer Adhäsionsrezeptoren, welche in dieser Arbeit untersucht worden sind. Des Weiteren wurde die immunologische Interaktion zwischen Endothelzellen und Monozyten, als nächster wichtiger der Atherosklerose analysiert. Dazu gehören zum einen die Adhäsion von Leukozyten und Monozyten an entzündlich aktivierte Endothelzellen und die darauffolgende Transmigration durch eine Endothelzellschicht. Weiterhin lag ein Augenmerk auf der Untersuchung relevanter, endothelialer Signalwege, wie dem MAPK-Signalweg und dem NF- κ B-Signalweg in Endothelzellen, da diese unter anderem an der Sekretion proatherogener Zytokine und Ausbildung von Adhäsionsrezeptoren beteiligt sind. Zusätzlich zu den bei Endothelzellen vermittelten Effekten, wurde ferner auch bei Monozyten analysiert, ob hier entsprechende antiatherogene Wirkung von Apremilast vorliegt.

Um zu klären, ob durch Apremilast lediglich einen Substanzeffekt vermittelt wird oder sogar ein Klasseneffekt über eine PDE4-Inhibition vorliegt, wurde in den ersten Experimenten außerdem die Wirkung von Roflumilast auf die Endothelzellen untersucht. In der experimentellen Forschung wird eine Vielzahl an PDE4-Inhibitoren genutzt wie z.B. Rolipram oder Cilomilast (Blease et al. 1998; Sanz et al. 2007). Jedoch sind Apremilast und Roflumilast in Deutschland die aktuell einzig zugelassenen PDE4-Inhibitoren, weshalb die Entscheidung für einen weiteren PDE4-Inhibitor auf Roflumilast fiel.

Für Untersuchungen von Endothelzellfunktionen stehen verschiedene Zelllinien zur Auswahl. In der Endothelzellofforschung werden als Goldstandard humane aortale Endothelzellen (HAEC), mikrovaskuläre Endothelzellen der Lunge (HLMEC) oder humane Umbilikalvenenendothelzellen (HUVEC) verwendet. Aufgrund der bereits erfolgten Etablierung von HUVEC wurden diese für die Untersuchungen verwendet. Gleiches gilt für die ausgewählte Monozytenzelllinie der THP-1 Zellen (Park et al. 2006; Qin 2012; Chanput et al. 2014).

Für die entzündliche Aktivierung von Endothelzellen gibt es verschiedene Induktoren. Dazu zählen u.a. Lipopolysaccharid (LPS), oxidiertes Lipoprotein niedriger Dichte (oxLDL) und der Tumornekrosefaktor- α (TNF α). Wir entschieden uns für TNF α , da er sowohl in der Psoriasis als auch in der Atherosklerose ein wichtiger Aktivator von Endothelzellen ist und relativ weit oben in der Pathogenese und Initiierung beider Krankheitsentitäten steht (Boehncke und Schön 2015; Jeon et al. 2017; Libby et al. 2019). Zum Abschluss und als Ausblick wurden die Endothelzellen mit dem für die Psoriasis spezifischeren Zytokin IL-17A stimuliert und einzelne Apremilast-vermittelte Effekte untersucht.

4.2 Vorversuch zur Zytotoxizität und Proliferation

Zu Beginn sollte ausgeschlossen werden, ob die für weitere Experimente verwendeten Konzentrationen von Apremilast und Roflumilast einen zytotoxischen oder antiproliferativen Effekt auf die Endothelzellen vermitteln. Bei sowohl zytotoxischen als auch antiproliferativen Wirkungen kann z.B. eine Aussage über die Menge der sezernierten Zytokine oder die ablaufenden Signalkaskaden verfälscht sein. Zur Bestimmung der Zytotoxizität wurde der klassische Laktatdehydrogenase-Test (LDH-Test) durchgeführt. In den Experimenten wurde jeweils die Positivkontrolle 1% Triton-X mitgeführt, um sicherzustellen, dass der Versuchsaufbau funktioniert. Wie in Kap. 3.1 Abb. 3.1 zu erkennen ist, weist Apremilast in den Konzentrationen von 2,5 – 40 μ M über eine

Behandlungsdauer von 24 Stunden keinen zytotoxischen Effekt in Endothelzellen im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle auf. Liang und Kollegen untersuchten die Zytotoxizität von Apremilast gegenüber humanen, nasalen Epithelzellen und stellten dort nach 24 Stunden zytotoxische Effekte ab 25 μM fest (Liang et al. 2021). Im Gegensatz dazu sahen McCann und Kollegen *ex vivo* bei einem kultivierten Homogenat aus Ratten-Lymphknoten, dass unter Behandlung mit Apremilast 100 μM über 48 Stunden keine zytotoxischen Effekte vermittelt wurden (McCann et al. 2010). Bei unseren Experimenten sahen wir zytotoxische Reaktionen nur für Roflumilast, welche ab einer Konzentration von 20 μM auftraten. In der Arbeit von Sanz und Kollegen wurden Roflumilast bis 1 μM und Rolipram bis 100 μM auf HUVEC verwendet. In der Methodik findet sich ein einzelner Satz, dass mittels eines LDH-Tests Zytotoxizitäten ausgeschlossen worden, allerdings kein aufgeführtes Experiment. Dies ist widersprüchlich mit unseren Ergebnissen. Allerdings lag die maximale Behandlungsdauer dort nur bei 3 Stunden (Sanz et al. 2007).

Zur Bestimmung des Proliferationsverhaltens der HUVEC wurde der Bromdesoxyuridin-Inkorporationstest (BrdU-Inkorporationstest) eingesetzt. Dieser erlaubt, die Proliferationstendenz im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle darzustellen. Hier zeigte sich ein ähnliches Bild. Während unter Behandlung mit Apremilast in den Konzentrationen von 2,5 – 40 μM kein Effekt auf die Proliferation zu beobachten war, inhibiert Roflumilast ab 20 μM signifikant die Proliferation im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (Kap. 3.1 Abb. 3.2). Aufgrund dessen wurde in den Versuchen für Roflumilast 10 μM als höchste Konzentration eingesetzt. Massimi und Kollegen beobachteten bei Rolipram in aufsteigender Dosierung bis 25 μM eine Reduktion der Proliferation von Hep2-Zellen (immortalisierte, humane Tumorzellen) nach einer Behandlung ab 48 Stunden (Massimi et al. 2017). McCann und Kollegen sahen in den von Ratten stammenden Kulturen der Lymphknoten bereits ab einer Konzentration von 0,1 μM Apremilast eine signifikante Reduktion der Proliferation. Dies zeigte sich dosisabhängig bis 10 μM , wobei Rolipram in einer Dosierung von 100 μM die stärksten Effekte vermittelte. Rolipram wurde nur in dieser Konzentration als Vergleich mitgeführt (McCann et al. 2010).

In der Literatur sind bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Daten für Apremilast und Roflumilast in Bezug auf Zytotoxizität und Proliferation in Endothelzellen beschrieben. Dies sind somit die ersten Ergebnisse zum Verhalten von Apremilast in Bezug auf Zytotoxizitäts- und Proliferationsverhalten von humanen Endothelzellen *in vitro*.

4.3 Effekt von Apremilast und Roflumilast auf proinflammatorische Zytokine und Chemokine

Verschiedene Zytokine und Chemokine sind tragende Mediatoren bei entzündlichen Geschehen und somit auch ein wesentlicher Teil in der Entstehung von atherosklerotischen Läsionen (McLaren et al. 2011). In der Einleitung im Kap. 1.1.3.3 wurde bereits beschrieben, dass unter anderem GM-CSF, IP-10, MCP-1 und IL-8 in diesem Zusammenhang von essentieller Bedeutung sind. Schafer und Kollegen untersuchten welche Einflüsse Apremilast in Monozyten aus peripherem Blut (PBMC) und T-Lymphozyten auf die Sekretion verschiedener proinflammatorische Zytokine vermittelt. So zeigten sie, dass *in vitro* die Sekretion von u.a. TNF α , MCP-1, und IP-10 in LPS-stimulierten PBMC und in LPS-stimulierten primären humanen T-Zellen die Sekretion von IL-2, GM-CSF und IL-17 durch Apremilast gesenkt werden konnte. (Schafer et al. 2010; Schafer et al. 2014). In der Arbeit von Wang und Kollegen konnten erste Hinweise für eine anti-entzündliche Wirkung von Apremilast in aktivierten Endothelzellen gezeigt werden. Apremilast inhibierte *in vitro* die oxLDL-induzierte Sekretion von MCP-1 in humanen aortalen Endothelzellen (HAEC) über die Hemmung der c-Jun-N-terminalen Kinase (JNK) und der damit verbundenen Aktivierung von Krüppel-like-factor 6 (KLF). Nicht gezeigt wurde ein Vergleich mit einem anderen PDE5i oder der Effekt auf weitere proatherogene Zytokine wie z.B. GM-CSF oder IP-10 (Wang et al. 2020). Dies konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, und wird im Folgenden diskutiert. In unserer Arbeit sollte zunächst mittels eines Zytokin-Array der Einfluss von Apremilast auf die TNF α -induzierte Sekretion diverser Zytokine und Chemokine analysiert werden, um eine Übersicht über inhibierbare Zytokine zu schaffen. Die Aussage im Zytokin-Array ist semi-quantitativ, weshalb keine genauen Aussagen über die Verhältnisse und Konzentrationen zu treffen sind. Die Auswertung erfolgte rein visuell, da es sich lediglich um eine Übersichtsaufnahme handelte. Es zeigte sich, dass TNF α (20 ng/ml) die Sekretion einer Vielzahl von proinflammatorischen Zytokinen hochreguliert, wie ENA-78, RANTES, CKA-3, GM-CSF, IP-10 und IL-6 (Abb. 3.3). Dass TNF α diese Effekte vermittelt, ist bereits bekannt (Hillyer et al. 2003; Gerhardt et al. 2015; Schwager et al. 2017; Wang et al. 2020). Für MCP-1 und IL-8 war keine Zunahme der Sekretion im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle zu beobachten, was daran liegen könnte, dass die Basalsekretion, wie in Abb. 3.4 sichtbar, bereits relativ hoch ist und das obere Detektionslimit bereits erreicht war. Eine vermehrte Sekretion durch TNF α -Stimulation ist jedoch in der Literatur beschrieben (Gerhardt et al. 2015; Wang et al. 2020). Bei Stimulation durch TNF α und Apremilast (40 μ M) zeigte sich im Vergleich zu TNF α alleine, dass die Sekretion von GM-CSF, IP-10, MCP-1 und evtl. IL-6

runterreguliert wurde. Diese Ergebnisse gaben erste Hinweise, dass Apremilast antiinflammatorische Effekte in $\text{TNF}\alpha$ -stimulierten Endothelzellen vermittelt. Es ist bekannt, dass diese Chemokine v.a. im Rahmen der Atherosklerose chemotaktische Wirkungen auf Monozyten oder T-Lymphozyten induzieren (insbesondere MCP-1 und IP-10) und daran beteiligt sind Monozyten in Makrophagen zu differenzieren (Heller et al. 2006; Braunersreuther et al. 2007; Libby et al. 2019). Da jedoch mittels dieser semi-quantitativen Methode keine Aussage über Konzentrationen oder Signifikanzen getroffen werden konnte, mussten diese Vorergebnisse mittels des quantitativen ELISA-Verfahren bestätigt werden. Aufgrund der bereits erwähnten Relevanz von IP-10, MCP-1, IL-8 und GM-CSF im Prozess der Atherosklerose, wurden diese Zytokine genauer untersucht. Zunächst wurde mittels eines quantitativen ELISA-Systems gezeigt, dass unter $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation (20 ng/ml) die Sekretion der oben erwähnten Zytokine signifikant erhöht wurde im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (Abb. 3.4). Wie oben erwähnt, sind diese Effekte unter $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation bereits in der Literatur beschrieben. Durch Zugabe von Apremilast (40 μM) wurde die Sekretion von MCP-1, IP-10 und GM-CSF signifikant gesenkt. Dabei war die Inhibierung von GM-CSF und IP-10 am stärksten, gefolgt von MCP-1. Die IL-8-Sekretion konnte durch Apremilast nicht inhibiert werden.

Ähnliche Ergebnisse lieferten Wang und Kollegen. Sie zeigten dass Apremilast (0,5 und 1 μM) die oxLDL-induzierte (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) Sekretion von $\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-8 und MCP-1 in HAEC inhibiert (Wang et al. 2020). Außerdem wurde in den Experimenten von Wang und Kollegen die IL-8-Sekretion inhibiert, was in den hier durchgeführten Experimenten mit $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation nicht zu beobachten war (Abb. 3.4). Auch Schafer und Kollegen zeigten, dass die LPS-stimulierte IL-8-Sekretion in PBMC durch Apremilast nicht inhibiert werden konnte (Schafer et al. 2010). Einen Erklärungsansatz könnte dabei die Arbeit von Yeh et al. liefern. Diese untersuchten den transkriptionellen Mechanismus wie Ox-Pac und $\text{TNF}\alpha$ die IL-8-Sekretion stimulieren. Ox-PAPC ist einer der aktiven Hauptkomponenten von minimal-modifiziertem LDL (MM-LDL) und dieses wiederum ist eine Variante von oxLDL (Itabe et al. 2003). Sie fanden heraus, dass durch Ox-PAPC die IL-8-Promoterregion zwischen -133 and -1481 bp aktiviert wurde. Die von $\text{TNF}\alpha$ jedoch in den NF- κB und AP-1 spezifischen Regionen zwischen -70 und -133 bp (Yeh et al. 2001). Die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der IL-8-Sekretion könnten ein Hinweis darauf sein, dass Apremilast nicht in beiden Regionen seine Effekte vermittelt.

Zusätzlich wurden die $\text{TNF}\alpha$ -aktivierten Endothelzellen ebenfalls mit Roflumilast behandelt, um zu zeigen, dass es sich um einen Phosphodiesterase-4-Inhibitor-vermittelten (PDE4i) Effekt und nicht um einen substanzspezifischen Effekt handelt. Roflumilast inhibierte wie Apremilast die Sekretion von GM-CSF und IP-10. Die

Sekretion von MCP-1 und IL-8 konnte dabei nicht gehemmt werden. In einer Arbeit von Buenestado und Kollegen mit Lungenmakrophagen, welche mit LPS stimuliert wurden, konnte Roflumilast jedoch die Sekretion von MCP-1 bereits ab einer Konzentration von 1 nM hemmen (keine Signifikanzen angegeben) (Buenestado et al. 2012). Eine Hemmung von MCP-1 durch Roflumilast scheint in Gesamtschau sehr wahrscheinlich, konnte in unseren Experimenten allerdings nicht gezeigt werden.

Diese Ergebnisse zeigen erstmalig, dass Apremilast in TNF α -stimulierten Endothelzellen *in vitro* die Sekretion relevanter pro-atherosklerotischer Zytokine, wie GM-CSF, MCP-1 und IP-10 inhibieren kann. In Übereinstimmung mit anderen Veröffentlichungen konnte somit der anti-entzündliche Effekt von PDE4i auf Endothelzellen und anderen Zellen untermauert werden. Unsere Ergebnisse unterstützen somit erheblich die Relevanz von Apremilast, bzw. PDE4i, in Bezug auf entzündliche Veränderungen am Endothel der Gefäße.

Konzentrationsabhängiger Effekt von Apremilast und Roflumilast auf GM-CSF

Im nächsten Teil wurde untersucht, ob ein konzentrationsabhängiger Effekt auf die TNF α -induzierte Sekretion proinflammatorischer Zytokine ausgeübt wird. Aufgrund der starken inhibitorischen Wirkung auf GM-CSF im vorausgegangenen Experiment, wurde dieses Zytokin für die konzentrations- bzw. zeitabhängige Untersuchung ausgewählt. Für die Konzentrationsreihe wurden die Zellen dafür mit TNF α (20 ng/ml) und verschiedenen, nicht toxischen Konzentrationen von Apremilast (10, 20 und 40 μ M) und Roflumilast (2,5, 5, 10 μ M) behandelt. Apremilast und auch Roflumilast inhibierten konzentrationsabhängig die GM-CSF Sekretion (Abb. 3.5). Vergleicht man den Effekt von Apremilast und Roflumilast, sieht man, dass beide in der Konzentration von 10 μ M ungefähr gleich stark die GM-CSF-Sekretion inhibieren.

Wang und Kollegen untersuchten wie Apremilast konzentrationsabhängig auf die oxLDL-induzierte MCP-1-Sekretion wirkt. Auch sie konnten feststellen, dass Apremilast mit steigender Konzentration (0,5 und 1 μ M) die MCP-1-Sekretion hemmt (Wang et al. 2020). Auch die Gruppe um Crilly und Kollegen untersuchten konzentrationsabhängige Effekte mit verschiedenen PDE4i auf entzündlich veränderte Zellen. Sie isolierten Synovialmembran (*ex vivo*) bei Patienten mit rheumatoider Arthritis, extrahierten Makrophagen und T-Zellen daraus und inkubierten diese mit unterschiedlichen Konzentrationen an Roflumilast, INH 0061 und INH 0062 (experimentelle PDE4-Inhibitoren). Alle drei PDE4-Inhibitoren hemmten konzentrationsabhängig die Sekretion von TNF α , MCP-1 und RANTES. In dieser Arbeit gibt es jedoch weder eine gesunde

Kontrollgruppe noch eine Positivkontrolle. Jedoch sind einige Konzentration (0,003 nM) nahezu bei 0, was man als Positivkontrolle werten kann (Crilly et al. 2011).

In unseren Experimenten wurde nun erstmals gezeigt, dass die beiden PDE4i Apremilast und Roflumilast einen konzentrationsabhängigen Effekt auf die GM-CSF-Sekretion in TNF α -stimulierten Endothelzellen vermitteln. In den folgenden Experimenten wurde nur eine Behandlung mit Apremilast durchgeführt, da auf dieser Behandlungssubstanz das Augenmerk liegt.

Zeitabhängiger Effekt von Apremilast auf GM-CSF

Für Apremilast wurde als nächstes die zeitabhängige Inhibition der GM-CSF-Sekretion analysiert. Dafür wurden die Zeitpunkte 3, 6, 9 und 24 Stunden untersucht. TNF α führte mit steigender Behandlungsdauer zu einer immer stärkeren Sekretion von GM-CSF (Abb. 3.6). Schon nach dreistündiger Inkubation wurde die TNF α -induzierte Sekretion von GM-CSF durch Zugabe von Apremilast gehemmt. Aber auch nach 6 und 9 Stunden konnte eine signifikante Inhibition beobachtet werden. In den anderen vorliegenden Arbeiten wurde jeweils eine Behandlungsdauer von 24 Stunden gewählt (Schafer et al. 2014; Wang et al. 2020).

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass die antiinflammatorische Wirkung von Apremilast auf Endothelzellen bereits nach kurzer Zeit einsetzt und diese bis zu 24 Stunden anhält.

Konzentrations- und zeitabhängiger Effekt auf das Transkriptom von GM-CSF

Um zu prüfen, ob Apremilast auch auf transkriptioneller Ebene Effekte vermittelt, wurde die mRNA-Expression von GM-CSF untersucht. Wie beim ELISA wurde eine Konzentrations- und Zeitreihe angefertigt. In der konzentrations- und zeitabhängigen Behandlung wurden die gleichen Konzentrationen (10, 20 und 40 μ M) und die gleichen Zeitpunkte (3, 6, 9 und 24 h) wie bei den Sekretionsexperimenten untersucht. In Abb. 3.7 ist deutlich zu sehen, dass Apremilast konzentrationsabhängig die GM-CSF-mRNA-Expression hemmt. Nur bei der Konzentration von 10 μ M konnte keine signifikante Inhibition erreicht werden. Auch die zeitabhängige Behandlung mit Apremilast (40 μ M) zeigte in allen Zeitpunkten, 3, 6, 9 und 24 h, eine signifikante Inhibition der TNF α -induzierten GM-CSF mRNA-Expression. Auch das Team um Schafer und Kollegen untersuchte die mRNA-Expression verschiedener proinflammatorischer Zytokine. Ziel war dort jedoch zunächst herauszufinden, bei welchem Zeitpunkt die LPS-Stimulation ihr Maximum an mRNA-Expression von TNF α , IFN, IL-12 und IL-23 in PBMC induzierte. Danach behandelten sie für die davor erörterte Zeitspanne die PBMC mit LPS, jeweils mit oder ohne Apremilast (10 μ M) und konnten beobachten, dass die mRNA-Expression

von allen untersuchten Zytokinen durch Apremilast signifikant inhibiert werden konnte. Ebenfalls untersuchten Wang und Kollegen die mRNA-Expression von MCP-1 in Endothelzellen. Sie konnten zeigen, dass Apremilast (0,5 und 1 μ M) in oxLDL-stimulierten HAEC die mRNA-Expression von MCP-1 nach 24 Stunden signifikant inhibiert. In Ergänzung zu Wang und Kollegen konnten wir hier zeigen, dass Apremilast auch schon in Zeitpunkten vor 24 Stunden einen inhibitorischen Einfluss auf die mRNA-Expression vermittelt.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Wang und Kollegen sowie Schafer und Kollegen, konnte erstmals gezeigt werden, dass Apremilast auch auf genregulatorischer Ebene einen Effekt auf die GM-CSF-Expression vermittelt, sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig. Dies ist insofern interessant, als damit gezeigt wurde, dass die Regulierung von GM-CSF bereits zu sehr frühen Zeitpunkten gehemmt werden kann.

4.4 Bedeutung von Apremilast auf die Inhibition wichtiger proentzündlicher Signalwege in humanen Endothelzellen

In unseren nächsten Untersuchungen fokussierten wir uns auf die Effekte von Apremilast auf wichtige proinflammatorische Signalwege in Endothelzellen. Klassische Signalwege, die durch TNF α in Endothelzellen aktiviert werden und dadurch u.a. die Expression wichtiger proinflammatorischer aber auch endothelialer Adhäsionsrezeptoren induzieren, sind zumeist der NF- κ B-Signalweg (Zhou et al. 2007; Gerhardt et al. 2015; Pan et al. 2016; Zhong et al. 2018; Xiao et al. 2020) und die verschiedenen MAPK-Signalwege (Zhong et al. 2012; Gerhardt et al. 2015; Wang et al. 2016).

4.4.1 MAPK

Die „mitogen-activated protein kinases“ (MAPK) sind an der entzündlichen Aktivierung von Endothelzellen maßgeblich beteiligt. Dazu gehören MAPK-abhängige Zunahme der Sekretion verschiedener proinflammatorischer Zytokine, aber auch die Expression von Adhäsionsrezeptoren (Kyriakis und Avruch 2001; Westra et al. 2005; Wang et al. 2016). So wurde bereits gezeigt, dass JNK1/2 an der TNF α -induzierten Sekretion von GM-CSF und MCP-1 oder ERK1/2 an der TNF α -induzierten Expression von ICAM-1 und VCAM-1 beteiligt sind (Zhong et al. 2012; Laviola et al. 2013). Wie bereits von anderen Gruppen beschrieben, führt TNF α zu einer vermehrten Phosphorylierung bzw. Aktivierung von JNK1/2, p38 und ERK1/2 in Endothelzellen (Gerhardt et al. 2015; Xiao et al. 2020). TNF α induzierte in allen unseren Versuchen eine vermehrte Phosphorylierung und damit Aktivierung von JNK1/2, p38 und ERK1/2 (Abb. 3.10). Als Abgleich diente die Gesamtexpression der jeweiligen MAPK, welche durch TNF α -Stimulation

bekannterweise nicht verändert wird (Gerhardt et al. 2015; Xiao et al. 2020; Wang et al. 2020). In unserer Arbeit untersuchten wir die Effekte von Apremilast auf die Aktivierung der verschiedenen MAPK in Endothelzellen. Dafür wurden die HUVEC mit TNF α (20 ng/ml) und Apremilast (20 μ M) behandelt. Wir konnten nachweisen, dass unter Apremilast die Phosphorylierung von JNK1/2, aber auch die von p38 im Vergleich zu TNF α alleine signifikant inhibiert werden konnte (Abb. 3.10). Am stärksten war die Hemmung von JNK1/2 beim Zeitpunkt 10 min, diese konnte aber auch bei 5 und 30 min beobachtet werden. Die Phosphorylierung von p38 war v.a. zu den späteren Zeitpunkten bei 30 und 60 min reduziert. Im Gegensatz zu JNK1/2 und p38 konnte Apremilast die Aktivierung von ERK1/2 nicht hemmen (Abb. 3.10). Welchen Effekt PDE-4-Inhibitoren, speziell Apremilast, auf die Aktivierung der MAPK in TNF α -stimulierten Endothelzellen vermitteln, ist nur zum Teil untersucht. Hier konnte nun erstmalig gezeigt werden, dass Apremilast die TNF α -induzierte Aktivierung von JNK1/2 und p38 in Endothelzellen hemmt. Unsere Ergebnisse konnten zum Teil in anderen Zelllinien, aber auch Endothelzellen, mit PDE4i beobachtet werden. Xiao und Kollegen untersuchten wie sich der PDE-4-Inhibitor FCPR16, auf die TNF α -induzierte JNK1/2-Phosphorylierung auswirkt. Sie nutzten dafür neuronale Zellen des Hippocampus einer Maus und beobachteten unter dem PDE-4-Inhibitor eine reduzierte Phosphorylierung von JNK 1/2 (Xiao et al. 2020). Kwak und Kollegen konnten in einer LPS-aktivierten murinen Monozytenzelllinie zeigen, dass Roflumilast die Phosphorylierung von p38 und JNK1/2 hemmte. Die Auswirkung auf ERK1/2 ist dabei nicht beschrieben, verleitet aber zur Annahme, dass keine Regulierung stattfand (Kwak et al. 2005). Die Arbeitsgruppe um Wang und Kollegen beschäftigten sich ebenfalls mit JNK1/2. Hauptsächliches Augenmerk lag auf der Untersuchung von KLF6. Sie zeigten zunächst, dass durch oxLDL die Expression von KLF6 inhibiert wird und die JNK1/2-Phosphorylierung zunimmt. Durch Applikation des JNK-Inhibitors SP600125 wurde gezeigt, dass die oxLDL induzierte Abnahme von KLF6 inhibiert werden konnte. Dies zeigt, dass u.a. JNK1/2 in der Regulierung von KLF6 involviert ist. Außerdem stellten sie fest, dass durch Apremilast die oxLDL-induzierte Abnahme von KLF6 verhindert wurde. Um dann schlussfolgern zu können, dass durch die Stabilisierung von KLF6 bzw. durch Apremilast in oxLDL-stimulierten Endothelzellen die MCP-1 und VCAM-1 Expression gehemmt wird, führten sie mittels siRNA-Experimenten einen „knock-down“ von KLF6 durch. Dabei beobachteten sie, dass durch den „Knockdown“ von KLF6, die Effekte von Apremilast auf die VCAM-1-Expression und MCP-1-Sekretion in oxLDL-stimulierten Zellen verschwand. Durch diese Beobachtungen vermuten sie, dass JNK1/2 an der Regulierung von MCP-1 und VCAM-1 beteiligt sein könnte (Wang et al. 2020).

GM-CSF Sekretion unter Inhibierung von JNK 1/2, ERK 1/2, und p38

Im nächsten Schritt wurde daher untersucht, wie sich die spezifische Inhibition der MAPK, analog zu NF- κ B, auf die Sekretion von GM-CSF auswirkt. Dabei konnte gezeigt werden, dass durch spezifische Inhibition von p38 und JNK1/2 die GM-CSF-Sekretion signifikant inhibiert wurde. Die ERK1/2-Inhibition führte jedoch zu keiner signifikanten Inhibition von GM-CSF (Abb. 3.11). Es gibt zahlreiche Arbeiten zu den MAPK-Inhibitoren und deren Effekt auf die Sekretion verschiedener proinflammatorischer Zytokine. So ist bekannt, dass durch spezifische Inhibition von JNK1/2 in TNF α -stimulierten humanen glatten Muskelzellen des Atemweges die Sekretion von GM-CSF gesenkt wird (Oltmanns et al. 2003). Ebenfalls konnten Koga und Kollegen zeigen, dass durch spezifische Inhibition von p38 in TNF α -stimulierten humanen Lungenfibroblasten die Sekretion von GM-CSF gesenkt wird (Koga et al. 2016). In Zusammenhang lieferten auch Kwak und Kollegen interessante Daten. Auch sie untersuchten die Wirkung verschiedenen MAPK-Inhibitoren und Roflumilast auf die Sekretion verschiedener proinflammatorischer Zytokine, jedoch in LPS-stimulierten murinen Monozyten. Sie untersuchten mittels ELISA, wie Roflumilast und die spezifischen MAPK-Inhibitoren sich auf die Sekretion von TNF α und IL-1 β auswirkten. Sie fanden heraus, dass durch Roflumilast und die spezifische JNK1/2- und p38-Inhibition die TNF α - und IL-1 β -Sekretion signifikant gehemmt werden kann, nicht jedoch durch die spezifische Inhibition von ERK 1/2 (Kwak et al. 2005).

In Anbetracht der in dieser Arbeit erhobenen Daten und denen von Kwak und Kollegen, lässt sich vermuten, dass durch die PDE4-vermittelte Inhibition von JNK 1/2 und p38 die Sekretion verschiedener proinflammatorischer Zytokine in humanen Endothelzellen gehemmt wird.

4.4.2 NF- κ B

Ein großer und wichtiger Teil der Arbeit war die Untersuchung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Er ist an einer Vielzahl von intrazellulären Prozessen und Signalwegen beteiligt, wie z.B. der Inflammation und der Apoptose (Hoesel und Schmid 2013; Mussbacher et al. 2019). Es ist bereits bekannt, dass NF- κ B an der TNF α -induzierten Expression von VCAM-1, ICAM-1, E-Selektin und Regulierung proinflammatorischer Zytokine wie MCP-1 und GM-CSF in Endothelzellen beteiligt ist (Denk et al. 2001; Zhong et al. 2012; Xiao et al. 2020). Auch die funktionelle Rolle von NF- κ B in der Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen *in vitro* wurde bereits untersucht (Wang et al. 2016). Die Rolle des NF- κ B-Signalwegs innerhalb der PV und Atherosklerose ist ebenfalls gut untersucht. Es konnte in Mausmodellen der Psoriasis gezeigt werden, dass durch spezifische Inhibition

von NF- κ B die epidermale Dicke und das Entzündungsinfiltrat reduziert werden konnte (Gareus et al. 2008; Irrera et al. 2017). Bei Psoriasis-Patienten zeigt sich eine deutliche Aktivierung von NF- κ B in psoriatischen Läsionen aber auch klinisch gesunder Haut verglichen zu gesunden Probanden (Lizzul et al. 2005). Ähnliche Beobachtungen konnten innerhalb der Atherosklerose und der rheumatoiden Arthritis gezeigt werden (Gareus et al. 2008; Brown et al. 2008). Hauptsächlich soll hier jedoch die Funktion im Rahmen des entzündlichen Geschehens in Endothelzellen betrachtet werden. TNF α ist ein potenter Aktivator von NF- κ B. Er führt zu einer vermehrten Phosphorylierung und damit Aktivierung von p65, gesteigerter Translokation von p65 in den Kern und erhöhter DNA-Bindung von p65 an den entsprechenden Bindungselementen (Zhou et al. 2007; Gerhardt et al. 2015; Pan et al. 2016). Wie PDE4-Inhibitoren auf die TNF α -induzierte p65-Translokation und NF- κ B-Aktivierung in Endothelzellen wirken ist weitestgehend unbekannt.

Zuerst wurde untersucht, ob Apremilast einen inhibierenden Effekt auf die TNF α -induzierte Phosphorylierung und damit Aktivierung von p65 besitzt. Da bekannt ist, dass die Phosphorylierung von p65 in Endothelzellen relativ schnell abläuft (Gerhardt et al. 2015), wurden die Zeitpunkte 0, 5, 10, 30 und 60 min gewählt. Als Abgleich wurde die Gesamt p65-Expression verwendet. In Abb. 3.13 ist die Phosphorylierung durch TNF α gezeigt, wobei das Maximum bei den Zeitpunkten 5 und 10 min lag. Apremilast in der Konzentration 20 μ M führte in den Zeitpunkten 5, 10 und 30 min zu keiner signifikanten Reduktion der Phosphorylierung. Erst nach 60 min senkte Apremilast signifikant die Phosphorylierung von p65.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, wie Apremilast die TNF α -induzierte p65-Translokation beeinflusst. Das ist insofern wichtig, da p65 in unstimulierten Zellen v.a. im Zytosol vorliegt und durch einen Reiz in den Zellkern, also den Ort des Wirkens, wandert (Hoesel und Schmid 2013; Mulero et al. 2019). Dies wurde mittels der etablierten Methoden Westernblot und Immunfluoreszenz untersucht. Zuerst soll hier auf die Methode des Westernblot eingegangen werden. Um herauszufinden, ob Apremilast einen Einfluss auf die p65-Translokation besitzt, mussten nukleäre Proteine isoliert werden. Da bekannt ist, dass I κ B α im Zytosol vorliegt und in der unstimulierten Endothelzelle dafür sorgt, dass p65 nicht in den Kern translozieren kann, wurden die zytosolischen Proteine auch mitbetrachtet. TNF α führt zu einem verstärkten Abbau von I κ B α (Brown et al. 1995; Zhong et al. 2018; Xiao et al. 2020). Als Abgleich zur Überprüfung der aufgetragenen Proteinmenge dienten konstitutiv exprimierte Proteine. Für die nukleären Proteine wurde PARP und für die zytosolischen Proteine GAPDH verwendet (Schafer et al. 2014; Gerhardt et al. 2015). In unseren Experimenten konnten

wir zeigen, dass TNF α die p65-Translokation in Endothelzellen bereits nach 5 min induziert (Abb. 3.14). Die Zugabe von Apremilast (20 μ M) führte ab ca. 10 min zu einer signifikanten Inhibierung der TNF α -induzierten p65-Translokation in den Zellkern. Bei Betrachtung der zytosolischen Fraktion fällt auf, dass durch TNF α -Stimulation die I κ B α -Expression abnimmt und bei 10 min fast kein I κ B α mehr nachweisbar ist. Dieses Phänomen konnte auch von anderen Gruppen beobachtet werden (Gerhardt et al. 2015; Xiao et al. 2020). Apremilast inhibierte in den Zeitpunkten 30 min und 60 min signifikant die TNF α -induzierte Wirkung auf I κ B α . Zu den Zeitpunkten wo Apremilast die p65-Translokation in den Zellkern inhibiert, wird gleichzeitig die I κ B α -Expression stabilisiert. Dies ist stimmig, da I κ B α die p65-Translokation in den Kern inhibiert (Brown et al. 1995; Hoesel und Schmid 2013; Mulero et al. 2019). Die TNF α -induzierte Hemmung des endogenen NF- κ B-Inhibitors I κ B α , konnte somit durch Apremilast wieder aufgehoben werden.

Um zu überprüfen, ob Apremilast auch zu einem späteren Zeitpunkt noch eine Wirkung auf die p65-Translokation besitzt, wurden Immunfluoreszenzuntersuchungen nach 4 Stunden durchgeführt. Gefärbt wurde p65 (Primär- und Sekundärantikörper, rot), das Zytoskelett (Phalloidin, grün) und der Zellkern (DAPI, blau). Es ist deutlich zu sehen (Abb. 3.15), dass TNF α eine Translokation von p65 in den Zellkern vermittelt. Interessant war nun zu betrachten, ob Apremilast nach 4 Stunden einen hemmenden Effekt auf die nukleäre Translokation von p65 zeigt. In Abb. 3.15 ist zu sehen, dass Apremilast (20 μ M) die TNF α -induzierte p65-Translokation, in den Konzentrationen 20 und 40 μ M auch noch nach 4 Stunden effektiv hemmt. Dies zeigt deutlich, dass Apremilast auch nach längerer Stimulation einen inhibierenden Effekt auf die nukleäre Translokation von p65 besitzt.

Trotzdem liefern diese Ergebnisse keine Antwort darauf, ob tatsächlich auch die NF- κ B-Aktivierung auf Promotorebene inhibiert wurde. In unseren Experimenten wurde gezeigt, dass TNF α die p65 DNA-Bindungsaktivität an einer NF- κ B-Konsensussequenz im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle signifikant steigert (Abb. 3.16). Apremilast konnte in den Konzentrationen 20 und 40 μ M die Aktivierung durch TNF α signifikant inhibieren. In Anbetracht der Vorergebnisse zur Phosphorylierung bzw. Aktivierung und Translokation von p65, scheint Apremilast die Aktivierung von NF- κ B vor allem durch die verringerte Translokation von p65 in den Kern zu inhibieren. Zum aktuellen Stand der Literatur sind dies die ersten Ergebnisse, welche zeigen, dass Apremilast in TNF α -stimulierten Endothelzellen die Phosphorylierung und Translokation von p65, sowie den Abbau von I κ B α und somit die NF- κ B-Aktivierung inhibiert. Diese Beobachtungen werden teilweise bestätigt durch Untersuchungen von weiteren Arbeitsgruppen mit PDE4i in nicht-endothelialen Zellen. Xiao und Kollegen gingen ähnlich vor. Sie

verwendeten jedoch neuronale Zellen des Hippocampus einer Maus (HT-22), welche sie mit $\text{TNF}\alpha$ -stimulierten und mit FCPR16, einem neuen experimentellen PDE-4-Inhibitor, behandelten. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die PDE-4-Inhibition die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte p65-Translokation gehemmt wird (Xiao et al. 2020). Die Arbeitsgruppe um Imam und Kollegen untersuchte wie sich Apremilast auf die kardiotoxische Wirkung von Doxorubicin in Mäusen auswirkt. Es wurde die Expression von p65 und $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ in murinen Herzgewebekomplexen untersucht. Unter Doxorubicin nahm die p65-Translokation und die $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Degradation im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe zu. Apremilast konnte diesen Effekt signifikant inhibieren. Des Weiteren konnte Apremilast auch die NF- κB -Promoteraktivität inhibieren (Imam et al. 2018). Kwak und Kollegen untersuchten die Wirkung des PDE4i Roflumilast in LPS-aktivierten murinen Monozyten. Es konnte unter anderem gezeigt werden, dass die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine $\text{TNF}\alpha$ und IL-1 β inhibiert werden konnte. Diese Effekte wurden u.a. durch eine verringerte NF- κB -Promotoraktivität vermittelt (Kwak et al. 2005).

GM-CSF-Sekretion unter NF- κB -Inhibition

Mittels eines Inhibitors für NF- κB wurde außerdem untersucht, ob dadurch die GM-CSF-Sekretion inhibiert werden kann. Resveratrol ist ein bekannter Inhibitor von NF- κB in Endothelzellen (Ren et al. 2013; Gerhardt et al. 2015). Dafür wurden die Endothelzellen für 30 min mit Resveratrol (20 μM) vorbehandelt und schließlich $\text{TNF}\alpha$ (20 ng/ml) für weitere 10 Stunden dazugegeben. Es konnte beobachtet werden, dass durch Resveratrol die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte GM-CSF Sekretion gehemmt werden kann (Abb. 3.17). Eine andere Gruppe zeigte bereits passend dazu, dass NF- κB an der $\text{TNF}\alpha$ -induzierten GM-CSF-Sekretion in Endothelzellen beteiligt ist (Munoz et al. 1996). Auch Montanari und Kollegen konnten in einem Inhibitionsexperiment mittels Dimethylfumarat, ein weiterer Inhibitor von NF- κB in HUVEC und in HAEC, zeigen, dass NF- κB an der Regulierung von GM-CSF beteiligt ist (Montanari et al. 2016). Unsere Ergebnisse lieferten somit erste Hinweise, dass Apremilast über NF- κB -abhängige Signalwege, die endotheliale Expression von GM-CSF inhibiert. Der Zusammenhang zwischen endothelialer NF- κB -Inhibition und der daraus resultierenden Hemmung von GM-CSF, könnte mittels siRNA-Experimenten mit spezifischem „knock-down“ von NF- κB weiter verifiziert werden.

4.5 Wirkungen von Apremilast auf die Endothelzellfunktion unter inflammatorischen Bedingungen

Adhäsionsrezeptoren

Nachdem gezeigt wurde, dass Apremilast verschiedene an der Atherosklerose beteiligte Zytokine in TNF α -aktivierten Endothelzellen hemmt, wurden verschiedene Adhäsionsrezeptoren untersucht, da diese an der Interaktion von Leukozyten und Endothelzellen beteiligt sind und eine wichtige Rolle in der Entstehung der Atherosklerose spielen (Eriksson et al. 2001b; Galkina und Ley 2007; Libby et al. 2019). Untersucht wurden dazu die Adhäsionsmoleküle VCAM-1, ICAM-1, E-Selektin, PECAM-1 und JAM-A. Die HUVEC wurden für diesen Versuch mit TNF α (20 ng/ml) alleine oder in Kombination mit Apremilast (20 und 40 μ M) für 24 Stunden behandelt. Anschließend das Gesamtprotein geerntet und dieses im Westernblot aufgetragen.

Der erste Kontakt zwischen Leukozyten und Endothelzellen, nach entzündlicher Aktivierung und Sekretion verschiedener Zytokine und Chemokine, erfolgt bekannterweise über die Selektine. Das E-Selektin bei dem Prozess des „Rolling“ eine wichtige Rolle einnimmt (Dong et al. 1998; Eriksson et al. 2001a) und dass die E-Selektin Expression unter TNF α -Stimulation in vitro bei HUVEC zunimmt, konnte bereits gezeigt werden (Chang et al. 2014). Aus diesem Grund war es wichtig zu untersuchen, ob Apremilast einen inhibierenden Einfluss auf die Expression von E-Selektin besitzt. Wir konnten nachweisen, dass Apremilast in den Konzentrationen 20 μ M und 40 μ M die TNF α -induzierte E-Selektin-Expression signifikant inhibiert (Abb. 3.9). Die Arbeitsgruppe um Sanz und Kollegen zeigte 2007 mittels immunhistochemischer Methoden, dass in postkapillären Venen in Ratten, die LPS-induzierte E-Selektin-Expression durch den PDE4i Roflumilast, gehemmt werden konnte. Auf der anderen Seite konnten sie dieses Phänomen, dass Roflumilast alleine die TNF α -induzierte Oberflächenexpression von E-Selektin hemmt, in vitro mit HUVEC nicht nachweisen. Erst in der Kombinationsbehandlung mit Motapizone (PDE-3-Inhibitor), konnte eine Reduktion der Oberflächenexpression erreicht werden. Auch andere PDE4-Inhibitoren wie Rolipram oder Cilomilast, konnten nur in Anwesenheit von Motapizone eine Reduktion induzieren (Sanz et al. 2007). Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Arbeitsgruppe um Blease und Kollegen. Sie stimulierten humane mikrovaskuläre Zellen der Lunge (HLMVEC) mit TNF α und verwendeten Rolipram als einen weiteren PDE4i. Rolipram alleine konnte die TNF α -induzierte E-Selektin-Expression nicht inhibieren. Erst durch Zugabe des β ₂-Sympathomimetikum Salbutamol, konnte die Expression signifikant inhibiert werden (Blease et al. 1998). Unsere Ergebnisse zeigen somit als erstes, dass bereits eine

Monobehandlung mit dem PDE4i Apremilast zu einer Reduktion der TNF α -induzierten E-Selektin-Expression führt. Ein möglicher Erklärungsansatz mag in der möglichen PDE4-unabhängigen Wirkungen von Apremilast liegen. Ähnliches konnte die Arbeitsgruppe um Kataoka und Kollegen beobachten. Diese zeigten *in vitro*, dass in humanen epidermalen Keratinozyten PDE4- und cAMP-unabhängige Effekte durch Apremilast vermittelt werden. Unter Stimulation der oben genannten Zellen mit Prostaglandin E₂ und Behandlung mit den drei PDE4i Apremilast, Roflumilast und Crisaborol kam es jeweils zu einem messbaren, ähnlichen cAMP-Anstieg in den Zellen. Jedoch konnte nur unter Apremilast eine verminderte Aktivierung von ERK1/2 beobachtet werden, nicht jedoch unter Roflumilast oder Crisaborol. In peripheren mononukleären Blutzellen konnte dies nicht beobachtet werden, Apremilast sowie die anderen PDE4i hatten keinen Effekt auf die Aktivierung von ERK1/2 (Kataoka et al. 2020). Diese Ergebnisse können also ein Hinweis auf einen möglichen PDE4-unabhängigen Effekt von Apremilast sein.

Nach dem sog. „Rolling“ erfolgt die feste Adhäsion der Leukozyten an die Endothelzellen, welche auch als Zellarrest bezeichnet wird. Diese Funktion wird auf der Endothelzelle v.a. durch VCAM-1 und ICAM-1 vermittelt (Galkina und Ley 2007; Čejková et al. 2016; Mauersberger et al. 2021). Auch diese sind in atherosklerotischen Läsionen hochreguliert (Davies et al. 1993) und werden bei oxLDL und TNF α -Stimulation *in vitro* vermehrt exprimiert (Ou et al. 2009; Ende et al. 2014). Unsere Ergebnisse zeigen, dass Apremilast (20 und 40 μ M) die TNF α -induzierte VCAM-1 Expression signifikant inhibieren konnte. Die ICAM-1-Expression wurde jedoch nicht durch Apremilast inhibiert, sondern, auch wenn nicht signifikant, tendenziell eher gesteigert (Abb. 3.9). Ähnliches zeigten Wang und Kollegen. Sie untersuchten den Effekt von Apremilast auf die VCAM-1-Expression in oxLDL-stimulierten Endothelzellen. Sie stellten ebenfalls fest, dass Apremilast die VCAM-1 Expression signifikant inhibieren kann. Die Expression von E-Selektin und ICAM-1 wurde jedoch nicht untersucht, sodass darauf keine Rückschlüsse gezogen werden können (Wang et al. 2020). Weitere Untersuchungen gibt es nur zu anderen PDE- bzw. PDE4i. Die Gruppe um Pober und Kollegen führten Experimente mit TNF α -stimulierten Endothelzellen alleine und in Kombination mit Forskolin, einem Aktivator der Adenylatzyklase und/oder mit dem nichtselektiven PDEi IBMX durch. Beide führten in den Zellen zu einem cAMP-Anstieg. Daraufhin untersuchten sie die Expression von VCAM-1, ICAM-1 und E-Selektin. Die Expression von VCAM-1 und E-Selektin wurde reduziert, interessanterweise nicht jedoch die von ICAM-1. Dieser Umstand konnte jedoch nicht bis ins Detail geklärt werden (Pober et al. 1993). Rahman und Kollegen zeigten jedoch, dass die Thrombin-induzierte Expression von ICAM-1 durch einen

cAMP-Anstieg, vermittelt durch Forskolin, inhibiert werden kann (Rahman et al. 2004). In der Arbeit von Blease und Kollegen wurde neben der E-Selektin-Expression auch die VCAM-1- und ICAM-1-Expression in TNF α -stimulierten humanen mikrovaskulären Endothelzellen untersucht. Rolipram alleine konnte keinen der Adhäsionsrezeptoren in seiner Expression reduzieren. Nur in Kombination mit Salbutamol gelang es die von VCAM-1 zu reduzieren, nicht jedoch von ICAM-1 (Blease et al. 1998). Trotz der Zugabe von Salbutamol, deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass eine Hemmung der ICAM-1-Expression auf Endothelzellen durch PDE4-Inhibitoren eher unwahrscheinlich ist. Dies wird zusätzlich untermauert durch Morandini und Kollegen, welche TNF α -stimulierte HUVEC mit Forskolin und Rolipram behandelten. Hier konnte sowohl die ICAM-1- als auch VCAM-1-Expression nicht reduziert werden. Trotz der zusätzlichen Erhöhung des cAMP-Spiegels durch Forskolin führte Rolipram nicht zur erhofften Runterregulierung (Morandini et al. 1996). Es scheint, als besitze Apremilast, in Bezug auf entzündliche aktivierte Endothelzellen und die VCAM-1-Expression, potentere Effekte, als beispielsweise Rolipram. Diese und die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse können auf einen PDE4- beziehungsweise cAMP-unabhängigen Effekt hinweisen. Denn wie Schaffer und Kollegen bereits zeigten, liegt die minimale wirksame Konzentration in Bezug auf den cAMP-Anstieg für Apremilast und Rolipram in einem ähnlichen Bereich, 1,4 μ M und 5 μ M. Die von Roflumilast allerdings deutlich niedriger bei 0,68 nM. Alle Experimente wurden in peripheren Blutmonozyten durchgeführt. Der Unterschied könnte durch verschiedene Ursachen erklärt werden. Entweder liegt hier zum Beispiel ein PDE4-unabhängiger Effekt vor oder eine unterschiedliche Affinität zu den Isoformen der PDE4. So zeigt sich für Apremilast eine niedrigere minimale inhibitorische Konzentration für die Isoformen PDE4B und PDE4D (27 nM und 33 nM) im Vergleich zu Rolipram (130 und 240 nM). Rolipram hingegen zeigt für die Isoform PDE4A eine minimale inhibitorische Konzentration von 3 nM, wohingegen Apremilast bei 14 nM liegt. Limitierend für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse könnten die unterschiedlichen Zelllinien und experimentellen Bedingungen sein (Mackenzie und Houslay 2000; Schafer et al. 2014). Einen Hinweis auf PDE4-unabhängige Effekte konnte bereits die Gruppe um Kataoka und Kollegen zeigen. Sie zeigten, dass Apremilast im Vergleich zu Roflumilast unabhängig vom cAMP-Anstieg die TNF α -Sekretion in PGE₂-stimulierten epidermalen Keratinozyten hemmen konnte. Als Ursache führten sie eine Inhibition des ERK/MEK-Signalweges an, welcher unter Roflumilast nicht gehemmt wurde (Kataoka et al. 2020).

Übereinstimmend mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit zeigten Wang und Kollegen den inhibitorischen Effekt von Apremilast auf die VCAM-1- Expression in oxLDL-

stimulierten Endothelzellen. Die Expression von E-Selektin und ICAM-1 wurde jedoch nicht untersucht, sodass darauf keine Rückschlüsse gezogen werden können (Wang et al. 2020). Interessanterweise beobachteten Schafer und Kollegen *in vivo* in psoriatischen Plaques, dass Apremilast zu einer Reduzierung der ICAM-1-Expression auf Keratinozyten führt (Schafer et al. 2010). Um abschließend herauszufinden ob zellspezifische und/ oder stimulationsspezifische Effekte oder gar kombiniert mit einem PDE4-unabhängigen Effekt vorliegen, müssen weitere Untersuchungen angestrebt werden. Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass Apremilast in TNF α -aktivierten Endothelzellen die Expression von VCAM-1 und E-Selektin inhibiert.

In weiteren experimentellen Ansätzen untersuchten wir den Einfluss auf die Expression von PECAM-1 und JAM-A. Mittels verschiedener *in vitro* Experimente konnte bereits gezeigt werden, dass PECAM-1 und JAM-A eine wichtige Rolle bei der Adhäsion der Endothelzellen untereinander haben. Sie sind somit wichtige Bausteine bei der Bildung der Endothelzellbarriere (Martín-Padura et al. 1998; Ozaki et al. 1999; Muller 2003). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten *in vitro* bereits feststellen, dass eine antikörpervermittelte Inhibition von entweder PECAM-1 (Muller 2003) oder JAM-A (Martín-Padura et al. 1998; Woodfin et al. 2007) zu einer Reduktion der Transmigration von Leukozyten durch eine stimulierte Endothelzellschicht führt. Dies weist darauf hin, dass PECAM-1 und JAM-A entscheidend an der Transmigration beteiligt sind. Im Unterschied zu den geläufigeren Adhäsionsrezeptoren konnte in der Literatur bei PECAM-1 als auch bei JAM-A unter TNF α -Stimulus *in vitro* keine veränderte Gesamtexpression festgestellt werden. Viel mehr zeigte sich unter TNF α -Stimulation, teilweise auch nur in Kombination mit Interferon- γ (Shaw et al. 2001), eine Umverteilung der Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche, vom apikalen Zellpol weg (Romer et al. 1995; Martín-Padura et al. 1998; Ozaki et al. 1999; Shaw et al. 2001). In unseren Experimenten sollte überprüft werden, ob Apremilast die Gesamtexpression von PECAM-1 und JAM-A verändert. Unter TNF α (20 ng/ml) konnte, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der anderen Arbeitsgruppen, keine Veränderung der Gesamtexpression beobachtet werden (Abb. 3.9). Auch die Zugabe von Apremilast in den Konzentrationen 20 und 40 μ M zu TNF α führte zu keiner weiteren Veränderung in der Expression beider Rezeptoren. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den bereits veröffentlichten Ergebnissen anderer Gruppen. Um eine Aussage über die zelluläre Umverteilung von PECAM-1 und JAM-A treffen zu können, müssten weitere Untersuchungen mittels konfokaler Lasermikroskopie durchgeführt werden.

Adhäsion von THP-1-Zellen and HUVEC

Nachdem wir zeigen konnten, dass Apremilast in aktivierten Endothelzellen sowohl die Sekretion chemotaktischer Zytokine, wie MCP-1 und IP-10, als auch die Expression endothelialer Adhäsionsrezeptoren, wie VCAM-1 und E-Selektin, hemmt, wurde als nächstes die funktionelle Relevanz dieser Beobachtungen überprüft.

Die erste, direkte Interaktion der Leukozytentransmigration stellt das Rolling bzw. die Adhäsion der Leukozyten an die Endothelzellen dar. Die Experimente wurden unter statischen Bedingungen und nicht unter Fluss durchgeführt, weshalb hier v.a. die Adhäsion der Monozyten und weniger der Prozess des Rollens untersucht wurde. Als Monozyten verwendeten wir in den Versuchen THP-1-Zellen. In Kombination mit HUVEC sind sie in der *in vitro*-Forschung ein gern genutztes Modell, um die Interaktion von Monozyten und Endothelzellen, speziell der Adhäsion und Transmigration zu erforschen (Chai et al. 2008; Kim et al. 2010; Wang et al. 2016). In den Versuchen wurden die HUVEC mit TNF α alleine oder in Kombination mit Apremilast (20 und 40 μ M) für 24 Stunden behandelt. Die THP-1-Zellen wurden nicht behandelt. Wie in Abb. 3.19 zu sehen ist, führt die Behandlung der HUVEC mit TNF α zu einem deutlichen Anstieg der THP-1-Adhäsion. In Kombination mit Apremilast in den Konzentrationen 20 und 40 μ M konnte die Adhäsion der THP-1-Zellen signifikant und konzentrationsabhängig inhibiert werden. Die Arbeitsgruppe um Wang und Kollegen führte ein ähnliches Experiment mit Apremilast durch. Es ist jedoch nicht ersichtlich, ob nur die Endothelzellen oder auch die Monozyten (U937) mit oxLDL (100 μ g/ml) und den verschiedenen Konzentrationen Apremilast behandelt wurden. Nichtsdestotrotz konnten auch sie beobachten, dass unter der Behandlung mit Apremilast (0,1 und 1 μ M) weniger Monozyten an die Endothelzellen adhärirten (Wang et al. 2020).

Weder die Ergebnisse Wang und Kollegen, noch die hier erhobenen waren jedoch die ersten, welche untersuchten wie PDE4i auf die Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen wirken. Ein Augenmerk bei der Einordnung der Ergebnisse der anderen Gruppen, soll vor allem auf der Durchführung der Adhäsionsversuche liegen, da sich diese doch deutlich unterscheiden. Jones und Kollegen untersuchten gleich mehrere PDE4i in ihrem Effekt auf die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten auf HUVEC. Sie inkubierten neutrophile Granulozyten 30 min mit den PDE4i Rolipram, Roflumilast und Cilomilast. Danach erfolgte eine Stimulation mit der Lösungsmittelkontrolle oder TNF α für 30 min und danach nochmals für 30 min mit Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP). fMLP ist ein Chemoattraktant, speziell für neutrophile Granulozyten. Der Versuchsaufbau von Jones und Kollegen erklärt sich dadurch, dass die hauptsächliche Betrachtung auf der möglichen Potenzierung des Effektes von fMLP durch TNF α lag.

Allerdings ergaben sich dadurch keine zusätzlichen Effekte auf die Adhäsion der neutrophilen Granulozyten. Nach der Inkubation gaben sie eine definierte Zellsuspension für 30 min auf die unstimulierten Endothelzellen. Alle PDE4i waren in unterschiedlichen Konzentrationen in der Lage, die Adhäsion der neutrophilen Granulozyten an die Endothelzellen signifikant zu inhibieren. In der Diskussion wird postuliert, mit Verweis auf andere Veröffentlichungen, dass die kurzzeitige Stimulation der HUVEC zu keinem signifikanten Anstieg der endothelialen Adhäsionsmoleküle führe und der Effekt daher tatsächlich nur auf der Behandlung der neutrophilen Granulozyten liegt. Ganz ausgeschlossen können die Effekte auf Endothelzellen dennoch nicht (Jones et al. 2005). Die Arbeitsgruppe um Sanz und Kollegen untersuchte ebenfalls den Effekt von PDE4i auf die Adhäsion. Sie verwendeten Roflumilast, Roflumilast (N-Oxid), den aktiven Metaboliten von Roflumilast, Rolipram und Cilomilast. Sie behandelten die HUVEC mit TNF α (0,3 ng/ml) für 3 h, entfernten das Behandlungsmedium und wuschen die Zellen. Danach gaben sie die Granulozyten mit den Behandlungssubstanzen hinzu. Alle PDE4i konnten die TNF α -induzierte Adhäsion hemmen. Am effektivsten waren dabei Roflumilast als auch Roflumilast N-Oxid, gefolgt von Cilomilast und zuletzt Rolipram (Sanz et al. 2007). Was in dem Versuchsaufbau von Sanz und Kollegen, wie bei Wang und Kollegen nicht komplett ausgeschlossen werden kann, ist die Auswirkung der PDE4i auf die Granulozyten. Sanz und Kollegen konnten jedoch auch schon *in vivo* beobachten, dass die LPS-stimulierte Adhäsion von Leukozyten in mesenterischen, postkapillären Venen durch Roflumilast konzentrationsabhängig inhibiert werden konnte (Sanz et al. 2007). Auch die Arbeitsgruppe um Blease und Kollegen beschäftigte sich mit der Wirkung eines PDE4i Rolipram, auf die TNF α -induzierte Adhäsion von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten auf humane mikrovaskuläre Lungenendothelzellen. Entweder wurde mit Rolipram alleine oder in Kombination mit Salbutamol behandelt. Wie in unseren Versuchen mit Apremilast wurde TNF α gleichzeitig mit den Behandlungssubstanzen hinzugegeben und vor der Hinzugabe der Granulozyten entfernt. Sie konnten feststellen, dass Rolipram alleine oder in Kombination mit Salbutamol, keinen Einfluss auf die Adhärenz eosinophiler Granulozyten besitzt. Jedoch konnte das Adhärenzieren der neutrophilen Granulozyten durch die Kombination aus Rolipram und Salbutamol, jedoch nicht Rolipram alleine, verringert werden im Vergleich zu TNF α (Blease et al. 1998). Selbstkritisch muss festgehalten werden, dass *in vivo* die Endothelzellen und die Leukozyten mit TNF α , aber vor allem auch mit Apremilast in Kontakt treten, da dieses sich gelöst in der Blutbahn befindet. Eine Behandlung beider Zellarten wäre daher wahrscheinlich näher an der Realität.

In Einklang mit den Ergebnissen von Jones und Kollegen sowie Wang und Kollegen kann aus unseren Daten geschlossen werden, dass PDE4i, speziell Apremilast, die Adhäsion verschiedener Leukozyten, v.a. Monozyten, an einer Endothelzellschicht *in vitro* hemmen. Unsere Ergebnisse zeigen zum ersten Mal, dass Apremilast über einen endothelzellspezifischen Effekt die Adhäsion von Monozyten hemmt.

Transmigration von THP-1-Zellen durch HUVEC

Nach der Adhäsion von Leukozyten bzw. Monozyten an die Endothelien erfolgt die Transmigration durch die Endothelzellschicht. Dieser Schritt führt dann letztendlich dazu, dass die Leukozyten bzw. Monozyten in die Intima gelangen, sich dort differenzieren und in Schaumzellen umwandeln (Gimbrone und García-Cardeña 2016; Libby et al. 2019). *In vitro* kann man dies nachstellen, indem die Endothelzellen auf Zellkultureinsätzen mit Poren ausgesät werden, die Leukozyten hinzugebt, und die Transmigration dieser misst. Dieser Versuchsaufbau wurde in dieser Arbeit verwendet. Nach Behandlung der HUVEC mit den verschiedenen Substanzen, wurde das Medium vollständig abgesaugt, die Zellen mit frischem Medium gewaschen, und die fluoreszenzmarkierten THP-1-Zellen hinzugegeben. Auch hier ist es wichtig klarzustellen, dass der Einfluss von TNF α bzw. in Kombination mit Apremilast auf die endothelzellabhängige Transmigration untersucht wurde, und durch die Waschvorgänge ein Mischeffekt ausgeschlossen wurde. In Abb. 3.20 ist zu sehen, dass die Behandlung mit TNF α zu einem signifikanten Anstieg der Transmigration der THP-1-Zellen führt. Apremilast in den Konzentrationen 20 und 40 μ M konnte die TNF α -induzierte Transmigration signifikant und konzentrationsabhängig senken. Apremilast scheint somit nicht nur die TNF α -induzierte, endothelzellabhängige Adhäsion, sondern auch Transmigration von Monozyten an bzw. durch eine humane Endothelzellschicht *in vitro* zu hemmen. Die Gruppe um Layseca-Espinosa und Kollegen beobachtete ähnliches. Die HUVEC wurden auch hier in Einsätzen mit Poren ausgesät und daraufhin für 3 Stunden mit TNF α stimuliert. Während der Stimulation wurden separat T-Lymphozyten für 24 Stunden mit Rolipram behandelt und diese dann mit dem Rolipram zusammen für 16 Stunden auf die Endothelzellen gegeben. Rolipram inhibierte die Migration der T-Lymphozyten durch die Endothelzellen signifikant. Wie bei Wang und Kollegen im Adhäsionsversuch, ist auch hier nicht klar zu erfassen, ob die Behandlung der Endothelzellen oder der T-Lymphozyten zu diesem Ergebnis beitragen (Layseca-Espinosa et al. 2003). Die Arbeitsgruppe um Sanz und Kollegen, welche *in vitro* nur die Adhäsion untersuchte, zeigte jedoch *in vivo* bei Ratten, dass Roflumilast die LPS-induzierte Transmigration von Leukozyten in postkapillären Venen hemmen konnte (Sanz et al. 2007). Wang und Kollegen welche ebenfalls die Wirkung von Apremilast auf das Adhäsionsverhalten von Monozyten gegenüber aktivierten Endothel untersuchten,

fürten keine Versuche zur Transmigration durch (Wang et al. 2020). Die von uns erhobenen Daten sind somit das erste in der Literatur beschriebene Ergebnis, welches zeigt, dass PDE4i, speziell Apremilast, die TNF α -induzierte, endothelzellabhängige Transmigration von Monozyten hemmt.

4.6 MMP-9 Sekretion in Monozyten

Um einen Eindruck zu bekommen, ob Apremilast auch atheroprotektive Einflüsse in Monozyten vermittelt, wurde in zwei Experimenten die Wirkung auf TNF α -stimulierte THP-1 Zellen untersucht. Schafer und Kollegen, untersuchten bereits, welche proinflammatorischen und chemotaktischen Zytokine Apremilast in LPS-induzierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) inhibiert (Schafer et al. 2014).

MMP-9 Sekretion von THP-1 Zellen

Zuerst untersuchten wir die Sekretion der MMP-9. In atherosklerotischen Mausmodellen ist beschrieben, dass ein Knockout der MMP-9 zu geringeren atherosklerotischen Läsionen führt (Luttun et al. 2004). Des Weiteren kam man zu dem Schluss, dass die MMP-9 chemotaktische Wirkungen auf die glatten Muskelzellen aus der Media ausübt, damit diese in die Intima einwandern können und in Folge zur Intimaverdickung beitragen (Cho und Reidy 2002; Johnson und Galis 2004). Für diesen Versuch wurden die THP-1 Zellen analog wie die Endothelzellen mit der Lösungsmittelkontrolle, TNF α (20 ng/ml) alleine oder in Kombination mit Apremilast (20 und 40 μ M) für 24 Stunden behandelt. In Abb. 3.21 wird deutlich, dass Apremilast in den Konzentrationen 20 und 40 μ M die TNF α -induzierte MMP-9 Sekretion signifikant hemmt. Jedoch konnte mit diesem Versuch nicht gezeigt werden, ob die Aktivität der MMP-9 auch inhibiert wurde, da ein ELISA genutzt und keine Zymographie durchgeführt wurde. Mittels dieser Methode könnte die Aktivität der sezernierten MMP-9 gemessen werden. Eine Aussage über die Aktivität ist deshalb hier nicht möglich.

Die Arbeitsgruppe um Sanchez und Kollegen untersuchten die Auswirkung des PDE4i Rolipram, auf die MMP-9-Aktivität im Rahmen der Autoimmunen zephalitis. Sie etablierten eine myelin-basic-protein-spezifische T-Zelllinie, welche sie zuvor aus Lymphknoten von Ratten gewannen und stimulierten diese mit IL-2 (50 ng/ml) alleine oder in Kombination mit Rolipram (50 und 100 μ M) für 48 Stunden. Die Zellkulturüberstände trugen sie einer Zymographie auf und beobachteten, dass Rolipram die Aktivität der MMP-9 reduzierte (Sánchez et al. 2005). Etwas näher an dem hier durchgeführten Versuchsaufbau war die Gruppe um Jones und Kollegen. Wie in Kap.4.5 beschrieben, untersuchten sie verschiedene PDE4-Inhibitoren auf ihre Wirkung in Bezug auf TNF α - und fMLP-stimulierte neutrophile Granulozyten. Wie in den anderen

Versuchen wurden die neutrophilen Granulozyten erst für 30 min mit den PDE4-Inhibitoren inkubiert, dann mit oder ohne TNF α (100 U/ml) für 30 min und dann mit fMLP für 30 min. Auch sie nutzten zur Auswertung die ELISA-Methode. Rolipram (0,001 μ M – 1 μ M), Cilomilast (0,001 μ M – 1 μ M) und Roflumilast (0,001 μ M – 1 μ M) konnten die fMLP-induzierte (mit oder ohne TNF α) MMP-9 Sekretion in den angegebenen Konzentrationen signifikant hemmen (Jones et al. 2005). Übereinstimmend mit Sanchez und Kollegen sowie Jones und Kollegen zeigen unsere Daten, dass PDE4i in verschiedenen stimulierten Leukozyten *in vitro* einen antisekretorischen Effekt auf die MMP-9 vermitteln. Weitere Experimente könnten zeigen, welche anderen proatherogenen Zytokine von Leukozyten durch PDE4i gehemmt werden.

4.7 Effekt von Apremilast auf die IL-17A-induzierte Sekretion proinflammatorischer Zytokine

Abschließen sollte die Arbeit mit einem geänderten Stimulus der endothelialen Aktivierung, IL-17A. Das Zytokin IL-17A ist an der Entstehung der Atherosklerose, jedoch spezifischer an der Pathogenese der Psoriasis vulgaris beteiligt (Erbel et al. 2009; Usui et al. 2012; Boehncke und Schön 2015). Welche Effekte Apremilast bei IL-17A-aktivierten Endothelzellen vermittelt, ist bisher kaum untersucht worden. In den durchgeführten Untersuchungen, konnte durch IL-17A eine vermehrte Sekretion von IL-6 und MCP-1 im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle gemessen werden. Für IL-8 zeigte sich zwar eine messbare Sekretion unter der Lösungsmittelkontrolle, jedoch konnte diese durch Zugabe von IL-17A nicht weiter gesteigert werden. Für GM-CSF und IP-10 zeigte sich, wie in den Stimulationsversuchen mit TNF α , keine messbare Sekretion unter der Lösungsmittelkontrolle, jedoch auch kein messbarer Anstieg durch die Stimulation mit IL-17A. Apremilast konnte bei den beiden durch IL-17A vermehrt sezernierten Zytokinen (IL-6 und MCP-1) einen signifikant hemmenden Effekt ausüben. Iyoda und Kollegen sowie Wang und Kollegen zeigten eine vermehrte Sekretion von MCP-1 unter IL-17A-Stimulation in mesenchymalen Zellen bzw. Chondrozyten (Iyoda et al. 2010; Wang et al. 2021). Bei den Untersuchungen mit Chondrozyten wurde als Behandlungssubstanz Apremilast eingesetzt, hier konnte konzentrationsabhängig die Sekretion von MCP-1 gehemmt werden (Wang et al. 2021). In den Untersuchungen mit den mesenchymalen Zellen konnte gezeigt werden, dass durch spezifische Hemmung von p38 diese Sekretion inhibiert werden konnte (Iyoda et al. 2010). In den hier durchgeführten MAPK-Experimenten zeigte sich unter Apremilast eine Hemmung der TNF α -induzierten p38-Aktivierung, ob dies unter IL-17A-Stimulation ebenso aussähe, ist nicht untersucht worden. In Einklang mit den Ergebnissen von Iyoda und Kollegen

könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass Apremilast eventuell über eine Hemmung der p38-Aktivierung, die IL-17A-induzierte MCP-1-Sekretion in Endothelzellen hemmt.

Für IL-6 wurde bereits gezeigt, dass es unter IL-17A-Stimulation zumindest in glatten Muskelzellen der Atemwege zu einer vermehrten Sekretion kommt (Hennes et al. 2004). Zu IL-6 konnten Schafer und Kollegen zeigen, dass Apremilast in den Konzentrationen 1 und 10 μM in LPS-stimulierten PBMC zu einer vermehrten Sekretion von IL-6 führt (Schafer et al. 2010). Ähnliches beobachteten auch Tang und Kollegen, welche in LPS-stimulierten murinen Makrophagen zeigten, dass unter der Aktivierung des cAMP-Signalweges mittels des Adenylatzyklaseaktivators Forskolin die IL-6-Sekretion sogar gesteigert werden konnte (Tang et al. 1998). Schafer und Kollegen diskutierten die cAMP-vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB (cAMP response element-binding protein), welcher zur Transkription von IL-6 und IL-10 führe (Schafer et al. 2010). Als Erklärungsansatz für die hier erhobenen Ergebnisse bestehen unterschiedliche Möglichkeiten. Die hier erhobenen Ergebnisse sind die ersten zur IL-17A-Stimulation plus der Behandlung mit Apremilast bzw. eines cAMP-Signalweg-Aktivators in Bezug auf die IL-6-Sekretion, Endothelzellen wurden verwendet oder es kann ein cAMP- bzw. PDE-unabhängiger Effekt vorliegen, der diesen Effekt über einen ganz anderen Mechanismus vermittelt.

Ein kurzer Abschnitt über die nicht hochregulierte Sekretion von GM-CSF, IL-8 und IP-10 unter Behandlung mit IL-17A. Honda und Kollegen konnten in Experimenten mit HUVEC und Stimulation mit IL-17A für GM-CSF unter der Lösungsmittelkontrolle eine messbare Sekretion von ca. 4 pg/ml gemessen werden, was unter dem Grenzwert der in dieser Arbeit genutzten ELISA-Kit's liegt. Unter Behandlung von IL-17A in der Konzentration 5 ng/ml kam es zu keinem signifikanten Anstieg, erst unter der Behandlung von 50 ng/ml (Honda et al. 2016). In Experimenten mit Bronchialepithelzellen, welche mit IL-17A (10 ng/ml) und $\text{TNF}\alpha$ (10 ng/ml) stimuliert wurden, kam es unter $\text{TNF}\alpha$ zu einem deutlichen, signifikanten Anstieg der IL-8-Sekretion und unter IL-17A zu einem minimalen Anstieg, welcher jedoch nicht signifikant war (Honda et al. 2016). Gleiches zeigte auch Bosteen und Kollegen, welche in humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) durch IL-17A keine vermehrte Sekretion von IL-8 im Vergleich zur Kontrolle induzieren konnten (Honda et al. 2016). Für IP-10 beobachteten sie wie wir keine Sekretion unter der Kontrolle und IL-17A (50 ng/ml), allerdings eine deutliche Sekretion unter Behandlung mit $\text{TNF}\alpha$ (10 ng/ml) (Bosteen et al. 2014). Diese und unsere Daten lassen vermuten, dass IL-17A kein potenter Induktor von IL-8, GM-CSF und IP-10 in humanen Endothelzellen ist.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, den Effekt des in Deutschland zur Behandlung der Psoriasis vulgaris zugelassenen PDE4-Inhibitors Apremilast auf TNF α -aktivierte Endothelzellen in Hinblick auf proatherogene Faktoren und Mechanismen zu untersuchen. Die Psoriasis vulgaris und die Atherosklerose können als Komorbiditäten auftreten, sich gegenseitig bedingen und teilen ähnliche klinische Risikofaktoren. Unter der Therapie mit Apremilast konnte in klinischen Studien bereits beobachtet werden, dass hier protektive Einflüsse auf Risikofaktoren, wie z.B. dem erhöhten BMI oder erhöhte Blutfettwerte (LDL, Triglyceride) vermittelt werden. TNF α als Stimulus der endothelialen Entzündungsreaktion in den durchgeführten Versuchen, kommt in beiden Erkrankungen sowohl in der Initiierung als Unterhaltung eine entscheidende Rolle zu. Unsere Experimente zeigen deutlich, dass Apremilast die Sekretion verschiedener proatherogener Zytokine wie GM-CSG, MCP-1 und IP-10 hemmt. Ähnliche Effekte zeigte auch Roflumilast, ein weiterer PDE4i. Weiterhin konnte für das Zytokin GM-CSF auf sekretorischer als auch auf transkriptionaler Ebene ein konzentrations- und zeitabhängiger Effekt von Apremilast gezeigt werden. Im nächsten Schritt wurde durch Apremilast die entzündliche Hochregulierung der wichtigen Adhäsionsrezeptoren VCAM-1 und E-Selektin gehemmt werden. Auf Ebene der Signalwege führte eine Behandlung mit Apremilast zur Reduktion der proinflammatorischen Aktivierung von p38 als auch JNK 1/2. Durch weitere Experimente konnten Hinweise für die Beteiligung der Hemmung von p38 und JNK 1/2 durch Apremilast auf die GM-CSF-Sekretion sowie Hochregulierung von VCAM-1 gezeigt werden. Apremilast führte ebenfalls zu einer Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Die zeigte sich durch eine verminderte Phosphorylierung, Translokation in den Zellkern als auch tatsächlichen Aktivierung. Ganz entscheidend konnte Apremilast diese Ergebnisse auch auf funktioneller Ebene zeigen, indem es die Adhäsion als auch Transmigration einer Monozytenzelllinie durch eine Endothelzellschicht inhibiert. Als Ausblick konnte Apremilast ebenfalls die Sekretion verschiedener proentzündlicher Zytokine, wie IL-6 und MCP-1, in IL-17A-stimulierten Endothelzellen, als auch die Sekretion der MMP-9 in einer Monozytenzelllinie hemmen. Unsere Experimente zeigen eindrucksvoll, dass Apremilast *in vitro* initiale Schritte der Pathogenese der Atherosklerose, einer relevanten Komorbidität der Psoriasis vulgaris hemmt. Apremilast zeigt somit sowohl klinisch als auch *in vitro* beeindruckende, protektive Eigenschaften auf wichtige Faktoren der Atherosklerose, eine der häufigsten Todesursachen in der westlichen Welt.

6 Summary

The aim of this study was to investigate the effect of the PDE4 inhibitor apremilast, which is approved in Germany for the treatment of psoriasis vulgaris, on TNF α -activated endothelial cells with regard to proatherogenic factors and mechanisms. Psoriasis vulgaris and atherosclerosis can occur as comorbidities, are mutually dependent and share similar clinical risk factors. In clinical studies, treatment with apremilast has already been shown to have a protective effect on risk factors such as increased BMI or elevated blood lipid levels (LDL, triglycerides). TNF α , which was used as the stimulus of the endothelial inflammation in the experiments, plays a decisive role in both diseases, both in the initiation and maintenance. Our experiments clearly show that apremilast inhibits the secretion of various proatherogenic cytokines such as GM-CSG, MCP-1 and IP-10. Roflumilast, another PDE4i, also showed similar effects. Furthermore, a concentration- and time-dependent effect of apremilast was shown for the cytokine GM-CSF at both the secretory and transcriptional levels. In the next step, the inflammatory upregulation of the important adhesion receptors VCAM-1 and E-selectin was inhibited by apremilast. At the pathway level, apremilast treatment led to a reduction in proinflammatory activation of p38 and JNK 1/2. Further experiments provided evidence for the involvement of apremilast inhibition of p38 and JNK 1/2 in GM-CSF secretion and upregulation of VCAM-1. Apremilast also led to an inhibition of the transcription factor NF- κ B, which was shown by reduced phosphorylation, translocation into the cell nucleus as well as actual activation. Crucially, apremilast was also able to demonstrate these results on a functional level by inhibiting the adhesion as well as transmigration of a monocyte cell line through an endothelial cell layer. Apremilast was also able to inhibit the secretion of various pro-inflammatory cytokines, such as IL-6 and MCP-1, in IL-17A-stimulated endothelial cells, as well as the secretion of MMP-9 in a monocyte cell line. Our experiments show impressively that apremilast inhibits in vitro initial steps of the pathogenesis of atherosclerosis, a relevant comorbidity of psoriasis vulgaris. Apremilast thus shows impressive protective properties both clinically and in vitro on important factors of atherosclerosis, one of the leading causes of death in the western world.

7 Abkürzungsverzeichnis

ApoE	dt. Apolipoprotein E
APS	dt. Ammoniumperoxodisulfat
BCECF, AM	engl. 2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(and-6)- Carboxyfluorescein, Acetoxymethyl Ester
BMI	engl. body mass index
BrdU	dt. Bromdesoxyuridin
BSA	dt. Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CD	engl. cluster of differentiation dt. Unterscheidungsgruppen
CREB	engl. cAMP response element-binding protein
DMSO	dt. Dimethylsulfoxid
DNA	engl. deoxyribonucleic acid dt. Desoxyribonukleinsäure
dNTP	dt. Desoxyribonukleosid-Triphosphate
ECL	engl. Enhanced chemiluminescence
EDTA	dt. Ethylendiamintetraessigsäure
ERK 1/2	engl. extracellular signal-regulated kinase 1/2
ELISA	engl. Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMSA	engl. Electrophoretic Mobility Shift Assay
E-Selektin	engl. endothelial selectin
FACS	engl. Fluorescence-activated cell sorting dt. Durchflusszytometrie
FKS	dt. Fetales Kälberserum
For.	engl. forward; dt. Vorwärts
g	Normalfallbeschleunigung
GAPDH	engl. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase dt. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	engl. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

	dt. Granulozyten-Makrophagen/Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
HAEC	Humane aortale Endothelzellen
HDL	engl. High density lipoprotein dt. Lipoprotein hoher Dichte
HEPES	engl. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid dt. 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure
HUVEC	Humane Umbilikalvenenendothelzellen
HRP	engl. horseradish peroxidase dt. Meerrettichperoxidase
ICAM-1	engl. Intercellular Adhesion Molecule 1 dt. Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül 1
Ig	dt. Immunglobulin
IκBα	engl. nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
IL	dt. Interleukin
IP-10	engl. Interferon gamma-induced protein 10
JAM-A	engl. Junctional adhesion molecule A dt. Junktionales Zelladhäsionsmolekül A
JNK 1/2	engl. c-Jun N-terminal kinase 1/2 dt. c-Jun-N-terminale Kinase 1/2
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	engl. Low density liporprotein dt. Lipoprotein niederer Dichte
MAPK	engl. Mitogen-activated protein kinase
MetS	dt. Metabolisches Syndrom
MCP-1	engl. monocyte chemoattractant protein 1
M-CSF	engl. Macrophage colony-stimulating factor dt. Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
mM	Millimolar
MMP-9	engl. Matrix metalloproteinase-9 dt. Matrix-Metalloproteinase 9

MP	dt. Milchpulver
mRNA	engl. messenger ribonucleic acid dt. Boten-Ribonukleinsäure
NF- κ B	engl. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NO	dt. Stickstoffmonoxid
PECAM-1	engl. Platelet endothelial cell adhesion molecule 1 dt. Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül 1
PARP	engl. Poly (ADP-ribose) polymerase 1 dt. Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1
PBS	engl. phosphate-buffered saline dt. Phosphatgepufferte Salzlösung
PBMC	engl. Peripheral Blood Mononuclear Cell dt. mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PDC	Plasmazytoide dendritische Zellen
PDE	Phosphodiesterase
PDE4	Phosphodiesterase-4
PDE4i	Phosphodiesterase-4-Inhibitor
RT-PCR	engl. reverse transcriptase polymerase chain reaction dt. Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
PV	Psoriasis vulgaris
PVDF	dt. Polyvinylidenfluorid
Rev.	engl. reverse; dt. rückwärts
RNase	Ribonukleasen
RNA	engl. ribonucleic acid dt. Ribonukleinsäure
RPMI	engl. Roswell Park Memorial Institute (Medium)
SDS	engl. Sodium dodecyl sulfate dt. Natriumdodecylsulfat
TBS-T	engl. Tris-buffered saline with tween20
TEMED	engl. Tetramethylethylenediamine dt. Tetramethylethylendiamin

THP-1	Tohoku Hospital Pediatrics-1 (Monozytenzelllinie)
TMB	dt. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TRIS	engl. tris(hydroxymethyl)aminomethane dt. Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TNF α	dt. Tumornekrosefaktor-Alpha
VCAM-1	engl. Vascular cell adhesion molecule 1 dt. Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1

8 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1:** Initiierung der Atherosklerose
- Abb. 3.1:** Konzentrationsabhängiger Einfluss von Apremilast und Roflumilast auf die Zytotoxizität von HUVEC.
- Abb. 3.2:** Konzentrationsabhängiger Einfluss von Apremilast und Roflumilast auf die Proliferation von HUVEC.
- Abb. 3.3:** Apremilast inhibiert die Sekretion verschiedener proinflammatorischer Zytokine in TNF α -stimulierten HUVEC (Zytokin-Array).
- Abb. 3.4:** Apremilast und Roflumilast inhibieren die Sekretion von GM-CSF, IP-10, MCP-1 in TNF α -stimulierten HUVEC.
- Abb. 3.5:** Apremilast und Roflumilast inhibieren konzentrationsabhängig die GM-CSF-Sekretion in TNF α -stimulierten in HUVEC.
- Abb. 3.6:** Apremilast inhibiert zeitabhängig die TNF α -induzierte GM-CSF-Sekretion in HUVEC.
- Abb. 3.7:** Apremilast inhibiert konzentrationsabhängig die TNF α -stimulierte GM-CSF-Transkription in HUVEC.
- Abb. 3.8:** Apremilast inhibiert zeitabhängig die TNF α -stimulierte GM-CSF-Transkription in HUVEC.
- Abb. 3.9:** Apremilast inhibiert die Expression von VCAM-1 und E-Selektin in TNF α -aktivierten HUVEC.
- Abb. 3.10:** Apremilast inhibiert die TNF α -induzierte Phosphorylierung der MAPK JNK1/2 und p38 in HUVEC
- Abb. 3.11:** Effekt von MAPK-Inhibitoren auf die TNF α -induzierte GM-CSF-Sekretion in HUVEC.
- Abb. 3.12:** Effekt von MAPK-Inhibitoren auf die TNF α -induzierte Expression endothelialer Adhäsionsrezeptoren in HUVEC.
- Abb. 3.13:** Apremilast inhibiert langsam die TNF α -induzierte Phosphorylierung von p65 in HUVEC.
- Abb. 3.14:** Apremilast inhibiert die p65-Translokation in den Nukleus und stabilisiert I κ B α in TNF α -stimulierten HUVEC.

- Abb. 3.15:** Apremilast inhibiert die TNF α -induzierte p65-Translokation in den Nukleus.
- Abb. 3.16:** Apremilast hemmt konzentrationsabhängig die TNF α -stimulierte NF- κ B-Aktivierung in HUVEC.
- Abb. 3.17:** Der NF- κ B-Inhibitor Resveratrol hemmt die TNF α -induzierte GM-CSF Sekretion in HUVEC.
- Abb. 3.18** Wirkung der Inhibition von p65 auf die TNF α -induzierte Expression verschiedener Adhäsionsrezeptoren in HUVEC.
- Abb. 3.19:** Apremilast inhibiert die TNF α -induzierte Adhäsion von THP-1-Zellen an HUVEC.
- Abb. 3.20:** Apremilast inhibiert die TNF α -induzierte Transmigration von THP-1-Zellen durch HUVEC.
- Abb. 3.21:** Apremilast inhibiert die TNF α -induzierte Sekretion von MMP-9 in THP-1-Zellen
- Abb. 3.22:** Apremilast inhibiert die IL-17A-induzierte Sekretion von Il-6 und MCP-1 in HUVEC.

9 Tabellenverzeichnis

- Tab. 2.1:** Zusammensetzung zytosolischer und nukleärer Protein-Extraktionspuffer
- Tab. 2.2:** Zusammensetzung BioLegend ELISA Puffer
- Tab. 2.3:** Zusammensetzung der Gele für den Westerblot
- Tab. 2.4:** Zusammensetzung Westernblot-Puffer
- Tab. 2.5:** Zusammensetzung für einen Ansatz der RT-PCR nach dem „OneStep-PCR-Kit“
- Tab. 2.6:** Ablauf der RT-PCR mit Temperatur, Zeit und Zyklenzahl
- Tab. 3.1:** Übersicht zum Effekt von MAPK-Inhibitoren auf die TNF α -induzierte Expression endothelialer Adhäsionsrezeptoren in HUVEC

10 Literaturverzeichnis

Aguilar, M.; Bhuket, T.; Torres, S.; Liu, B.; Wong, R. J. (2015): Prevalence of the metabolic syndrome in the United States, 2003-2012. In: *JAMA* 313 (19), S. 1973–1974. DOI: 10.1001/jama.2015.4260.

Aiello, R. J.; Bourassa, P. A.; Lindsey, S.; Weng, W.; Natoli, E.; Rollins, B. J.; Milos, P. M. (1999): Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19 (6), S. 1518–1525. DOI: 10.1161/01.ATV.19.6.1518.

Ajuebor, M. N.; Flower, R. J.; Hannon, R.; Christie, M.; Bowers, K.; Verity, A.; Perretti, M. (1998): Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 recruits monocytes in the zymosan peritonitis model. In: *J Leukoc Biol* 63 (1), S. 108–116. DOI: 10.1002/jlb.63.1.108.

Albelda, S. M.; Muller, W. A.; Buck, C. A.; Newman, P. J. (1991): Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. In: *J Cell Biol* 114 (5), S. 1059–1068. DOI: 10.1083/jcb.114.5.1059.

Alberti, K. G. M. M.; Eckel, R. H.; Grundy, S. M.; Zimmet, P. Z.; Cleeman, J. I.; Donato, K. A. et al. (2009): Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. In: *Circulation* 120 (16), S. 1640–1645. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644.

Alon, R.; Kassner, P. D.; Carr, M. W.; Finger, E. B.; Hemler, M. E.; Springer, T. A. (1995): The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. In: *J Cell Biol* 128 (6), S. 1243–1253. DOI: 10.1083/jcb.128.6.1243.

Armstrong, A. W.; Harskamp, C. T.; Armstrong, E. J. (2012): The association between psoriasis and obesity: a systematic review and meta-analysis of observational studies. In: *Nutr Diabetes* 2, e54. DOI: 10.1038/nutd.2012.26.

Arthur, J. S. C.; Ley, S. C. (2013): Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. In: *Nat Rev Immunol* 13 (9), S. 679–692. DOI: 10.1038/nri3495.

Aslam, M.; Ladilov, Y. (2022): Emerging Role of cAMP/AMPK Signaling. In: *Cells* 11 (2). DOI: 10.3390/cells11020308.

Assmann, G.; Carmena, R.; Cullen, P.; Fruchart, J. C.; Jossa, F.; Lewis, B. et al. (1999): Coronary heart disease: reducing the risk: a worldwide view. International Task Force for the Prevention of Coronary Heart Disease. In: *Circulation* 100 (18), S. 1930–1938. DOI: 10.1161/01.CIR.100.18.1930.

Badimon, L.; Vilahur, G. (2014): Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. In: *J Intern Med* 276 (6), S. 618–632. DOI: 10.1111/joim.12296.

Baliwag, J.; Barnes, D. H.; Johnston, A. (2015): Cytokines in psoriasis. In: *Cytokine* 73 (2), S. 342–350. DOI: 10.1016/j.cyto.2014.12.014.

Barnes, H.; Brown, Z.; Burns, A.; Williams, T. (2019): Phosphodiesterase 5 inhibitors for pulmonary hypertension. In: *Cochrane Database Syst Rev* 1, CD012621. DOI: 10.1002/14651858.cd012621.pub2.

Barquera, S.; Pedroza-Tobías, A.; Medina, C.; Hernández-Barrera, L.; Bibbins-Domingo, K.; Lozano, R.; Moran, A. E. (2015): Global Overview of the Epidemiology of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. In: *Arch Med Res* 46 (5), S. 328–338. DOI: 10.1016/j.arcmed.2015.06.006.

Basurto, L.; Gregory, M. A.; Hernández, S. B.; Sánchez-Huerta, L.; Martínez, A. D.; Manuel-Apolinar, L. et al. (2019): Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and fibroblast growth factor-21 (FGF-21) as biomarkers of subclinical atherosclerosis in women. In: *Exp Gerontol* 124, S. 110624. DOI: 10.1016/j.exger.2019.05.013.

Baudin, B.; Bruneel, A.; Bosselut, N.; Vaubourdolle, M. (2007): A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. In: *Nat Protoc* 2 (3), S. 481–485. DOI: 10.1038/nprot.2007.54.

Beavo, J. A.; Brunton, L. L. (2002): Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (9), S. 710–718. DOI: 10.1038/nrm911.

Blease, K.; Burke-Gaffney, A.; Hellewell, P. G. (1998): Modulation of cell adhesion molecule expression and function on human lung microvascular endothelial cells by inhibition of phosphodiesterases 3 and 4. In: *Br J Pharmacol* 124 (1), S. 229–237. DOI: 10.1038/sj.bjp.0701833.

Boehncke, W.-H.; Schön, M. P. (2015): Psoriasis. In: *The Lancet* 386 (9997), S. 983–994. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)61909-7.

Bolger, G.; Michaeli, T.; Martins, T.; St John, T.; Steiner, B.; Rodgers, L. et al. (1993): A family of human phosphodiesterases homologous to the dunce learning and memory gene product of *Drosophila melanogaster* are potential targets for antidepressant drugs. In: *Mol Cell Biol* 13 (10), S. 6558–6571. DOI: 10.1128/mcb.13.10.6558-6571.1993.

Bonetti, P. O.; Lerman, L. O.; Lerman, A. (2003): Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23 (2), S. 168–175. DOI: 10.1161/01.ATV.0000051384.43104.FC.

Boolell, M.; Gepi-Attee, S.; Gingell, J. C.; Allen, M. J. (1996): Sildenafil, a novel effective oral therapy for male erectile dysfunction. In: *Br J Urol* 78 (2), S. 257–261. DOI: 10.1046/j.1464-410x.1996.10220.x.

Bosteen, M. H.; Tritsarlis, K.; Hansen, A. J.; Dissing, S. (2014): IL-17A potentiates TNF α -induced secretion from human endothelial cells and alters barrier functions controlling neutrophils rights of passage. In: *Pflugers Arch* 466 (5), S. 961–972. DOI: 10.1007/s00424-013-1354-5.

Bourdillon, M. C.; Poston, R. N.; Covacho, C.; Chignier, E.; Bricca, G.; McGregor, J. L. (2000): ICAM-1 deficiency reduces atherosclerotic lesions in double-knockout mice (ApoE(-/-)/ICAM-1(-/-)) fed a fat or a chow diet. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20 (12), S. 2630–2635. DOI: 10.1161/01.ATV.20.12.2630.

Braunersreuther, V.; Mach, F.; Steffens, S. (2007): The specific role of chemokines in atherosclerosis. In: *Thromb Haemost* 97 (05), S. 714–721. DOI: 10.1160/TH07-01-0036.

Brown, K.; Gerstberger, S.; Carlson, L.; Franzoso, G.; Siebenlist, U. (1995): Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. In: *Science* 267 (5203), S. 1485–1488. DOI: 10.1126/science.7878466.

Brown, K. D.; Claudio, E.; Siebenlist, U. (2008): The roles of the classical and alternative nuclear factor-kappaB pathways: potential implications for autoimmunity and rheumatoid arthritis. In: *Arthritis Res Ther* 10 (4), S. 212. DOI: 10.1186/ar2457.

Buenestado, A.; Grassin-Delyle, S.; Guitard, F.; Naline, E.; Faisy, C.; Israël-Biet, D. et al. (2012): Roflumilast inhibits the release of chemokines and TNF- α from human lung

macrophages stimulated with lipopolysaccharide. In: *Br J Pharmacol* 165 (6), S. 1877–1890. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01667.x.

Calamera, G.; Moltzau, L. R.; Levy, F. O.; Andressen, K. W. (2022): Phosphodiesterases and Compartmentation of cAMP and cGMP Signaling in Regulation of Cardiac Contractility in Normal and Failing Hearts. In: *Int J Mol Sci* 23 (4). DOI: 10.3390/ijms23042145.

Cargnello, M.; Roux, P. P. (2011): Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. In: *Microbiol Mol Biol Rev* 75 (1), S. 50–83. DOI: 10.1128/MMBR.00031-10.

Carr, M. W.; Roth, S. J.; Luther, E.; Rose, S. S.; Springer, T. A. (1994): Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (9), S. 3652–3656. DOI: 10.1073/pnas.91.9.3652.

Catania, P. N. (1998): Viagra for home care patients. In: *Home Care Provid* 3 (4), S. 197–199. DOI: 10.1016/s1084-628x(98)90128-9.

Čejková, S.; Králová Lesná, I.; Poledne, R. (2016): Monocyte adhesion to the endothelium is an initial stage of atherosclerosis development. In: *Cor Vasa* 58 (4), e419-e425. DOI: 10.1016/j.crvasa.2015.08.002.

Chai, H.; Wang, Q.; Huang, L.; Xie, T.; Fu, Y. (2008): Ginsenoside Rb1 inhibits tumor necrosis factor- α -induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. In: *Biol Pharm Bull* 31 (11), S. 2050–2056. DOI: 10.1248/bpb.31.2050.

Chang, C.-C.; Chu, C.-F.; Wang, C.-N.; Wu, H.-T.; Bi, K.-W.; Pang, J.-H. S.; Huang, S.-T. (2014): The anti-atherosclerotic effect of tanshinone IIA is associated with the inhibition of TNF- α -induced VCAM-1, ICAM-1 and CX3CL1 expression. In: *Phytomedicine* 21 (3), S. 207–216. DOI: 10.1016/j.phymed.2013.09.012.

Chanput, W.; Mes, J. J.; Wichers, H. J. (2014): THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. In: *Int Immunopharmacol* 23 (1), S. 37–45. DOI: 10.1016/j.intimp.2014.08.002.

Chen, Q.; Jin, M.; Yang, F.; Zhu, J.; Xiao, Q.; Zhang, L. (2013): Matrix metalloproteinases: inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling. In: *Mediators Inflamm* 2013, S. 928315. DOI: 10.1155/2013/928315.

Chia, M. C. (1998): The role of adhesion molecules in atherosclerosis. In: *Crit Rev Clin Lab Sci* 35 (6), S. 573–602. DOI: 10.1080/10408369891234282.

Cho, A.; Reidy, M. A. (2002): Matrix metalloproteinase-9 is necessary for the regulation of smooth muscle cell replication and migration after arterial injury. In: *Circ Res* 91 (9), S. 845–851. DOI: 10.1161/01.RES.0000040420.17366.2E.

Chong, J.; Leung, B.; Poole, P. (2017): Phosphodiesterase 4 inhibitors for chronic obstructive pulmonary disease. In: *Cochrane Database Syst Rev* 9, CD002309. DOI: 10.1002/14651858.cd002309.pub5.

Christian, F.; Smith, E. L.; Carmody, R. J. (2016): The Regulation of NF- κ B Subunits by Phosphorylation. In: *Cells* 5 (1). DOI: 10.3390/cells5010012.

Conti, M.; Beavo, J. (2007): Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. In: *Annu Rev Biochem* 76, S. 481–511. DOI: 10.1146/annurev.biochem.76.060305.150444.

Crilly, A.; Robertson, S. E.; Reilly, J. H.; Gracie, J. A.; Lai, W.-Q.; Leung, B. P. et al. (2011): Phosphodiesterase 4 (PDE4) regulation of proinflammatory cytokine and chemokine release from rheumatoid synovial membrane. In: *Ann Rheum Dis* 70 (6), S. 1130–1137. DOI: 10.1136/ard.2010.134825.

Crowley, J.; Thaçi, D.; Joly, P.; Peris, K.; Papp, K. A.; Goncalves, J. et al. (2017): Long-term safety and tolerability of apremilast in patients with psoriasis: Pooled safety analysis for ≥ 156 weeks from 2 phase 3, randomized, controlled trials (ESTEEM 1 and 2). In: *J Am Acad Dermatol* 77 (2), 310-317.e1. DOI: 10.1016/j.jaad.2017.01.052.

Csiszar, A.; Smith, K.; Labinsky, N.; Orosz, Z.; Rivera, A.; Ungvari, Z. (2006): Resveratrol attenuates TNF- α -induced activation of coronary arterial endothelial cells: role of NF- κ B inhibition. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291 (4), H1694-9. DOI: 10.1152/ajpheart.00340.2006.

Cybulsky, M. I.; Iiyama, K.; Li, H.; Zhu, S.; Chen, M.; Iiyama, M. et al. (2001): A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. In: *J Clin Invest* 107 (10), S. 1255–1262.

Davies, M. J.; Gordon, J. L.; Gearing, A. J.; Pigott, R.; Woolf, N.; Katz, D.; Kyriakopoulos, A. (1993): The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-

1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. In: *J Pathol* 171 (3), S. 223–229. DOI: 10.1002/path.1711710311.

Denk, A.; Goebeler, M.; Schmid, S.; Berberich, I.; Ritz, O.; Lindemann, D. et al. (2001): Activation of NF-kappa B via the Ikappa B kinase complex is both essential and sufficient for proinflammatory gene expression in primary endothelial cells. In: *J Biol Chem* 276 (30), S. 28451–28458. DOI: 10.1074/jbc.M102698200.

Donahue, R. E.; Wang, E. A.; Stone, D. K.; Kamen, R.; Wong, G. G.; Sehgal, P. K. et al. (1986): Stimulation of haematopoiesis in primates by continuous infusion of recombinant human GM-CSF. In: *Nature* 321 (6073), S. 872–875. DOI: 10.1038/321872a0.

Dong, Z. M.; Chapman, S. M.; Brown, A. A.; Frenette, P. S.; Hynes, R. O.; Wagner, D. D. (1998): The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. In: *J Clin Invest* 102 (1), S. 145–152.

Dubsky, M.; Veleba, J.; Sojakova, D.; Marhefkova, N.; Fejfarova, V.; Jude, E. B. (2023): Endothelial Dysfunction in Diabetes Mellitus: New Insights. In: *Int J Mol Sci* 24 (13). DOI: 10.3390/ijms241310705.

EMA (2015): "Summary of Product Characteristics: Otezla apremilast".

Emini Veseli, B.; Perrotta, P.; Meyer, G. R. A. de; Roth, L.; van der Donckt, C.; Martinet, W.; Meyer, G. R. Y. de (2017): Animal models of atherosclerosis. In: *Eur J Pharmacol* 816, S. 3–13. DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.05.010.

Ende, G.; Poitz, D. M.; Wiedemann, E.; Augstein, A.; Friedrichs, J.; Giebe, S. et al. (2014): TNF- α -mediated adhesion of monocytes to endothelial cells-The role of ephrinA1. 24h TNF Behandlung auf HUVEC --> VCAM-1, ICAM-1, E-Selektin gehen hoch (Western-Blot). In: *J Mol Cell Cardiol* 77, S. 125–135. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2014.10.010.

Eppihimer MJ; Russell J; Langley R; Vallien G; Anderson DC; Granger DN (1998): Differential Expression of Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1) in Murine Tissues. In: *Microcirculation* 5 (2-3), S. 179–188. DOI: 10.1080/mic.5.2-3.179.188.

Erbel, C.; Chen, L.; Bea, F.; Wangler, S.; Celik, S.; Lasitschka, F. et al. (2009): Inhibition of IL-17A attenuates atherosclerotic lesion development in apoE-deficient mice. In: *J Immunol* 183 (12), S. 8167–8175. DOI: 10.4049/jimmunol.0901126.

Eriksson, E. E.; Xie, X.; Werr, J.; Thoren, P.; Lindbom, L. (2001a): Direct viewing of atherosclerosis in vivo: plaque invasion by leukocytes is initiated by the endothelial selectins. In: *FASEB J* 15 (7), S. 1149–1157. DOI: 10.1096/fj.00-0537com.

Eriksson, E. E.; Xie, X.; Werr, J.; Thoren, P.; Lindbom, L. (2001b): Importance of primary capture and L-selectin-dependent secondary capture in leukocyte accumulation in inflammation and atherosclerosis in vivo. In: *J Exp Med* 194 (2), S. 205–218. DOI: 10.1084/jem.194.2.205.

Fan, J.; Watanabe, T. (2022): Atherosclerosis: Known and unknown. In: *Pathol Int* 72 (3), S. 151–160. DOI: 10.1111/pin.13202.

Fang, N.; Jiang, M.; Fan, Y. (2016): Association Between Psoriasis and Subclinical Atherosclerosis: A Meta-Analysis. In: *Medicine (Baltimore)* 95 (20). DOI: 10.1097/MD.00000000000003576.

Ferguson, L. D.; Cathcart, S.; Rimmer, D.; Semple, G.; Brooksbank, K.; Paterson, C. et al. (2022): Effect of the phosphodiesterase 4 inhibitor apremilast on cardiometabolic outcomes in psoriatic disease—results of the Immune Metabolic Associations in Psoriatic Arthritis study. In: *Rheumatology (Oxford)* 61 (3), S. 1026–1034. DOI: 10.1093/rheumatology/keab474.

Fishbein, G. A.; Fishbein, M. C. (2009): Arteriosclerosis: rethinking the current classification. In: *Arch Pathol Lab Med* 133 (8), S. 1309–1316. DOI: 10.1043/1543-2165-133.8.1309.

Fossiez, F.; Djossou, O.; Chomarat, P.; Flores-Romo, L.; Ait-Yahia, S.; Maat, C. et al. (1996): T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. In: *J Exp Med* 183 (6), S. 2593–2603. DOI: 10.1084/jem.183.6.2593.

Frostegård, J.; Ulfgrén, A.-K.; Nyberg, P.; Hedin, U.; Swedenborg, J.; Andersson, U.; Hansson, G. K. (1999): Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. In: *Atherosclerosis* 145 (1), S. 33–43. DOI: 10.1016/S0021-9150(99)00011-8.

Fruchart, J.-C.; Nierman, M. C.; Stroes, E. S. G.; Kastelein, J. J. P.; Duriez, P. (2004): New risk factors for atherosclerosis and patient risk assessment. In: *Circulation* 109 (23 Suppl 1), III15-9. DOI: 10.1161/01.CIR.0000131513.33892.5b.

Galis, Z. S.; Muszynski, M.; Sukhova, G. K.; Simon-Morrissey, E.; Libby, P. (1995): Enhanced expression of vascular matrix metalloproteinases induced in vitro by cytokines and in regions of human atherosclerotic lesions. In: *Ann N Y Acad Sci* 748, S. 501–507. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1994.tb17348.x.

Galkina, E.; Ley, K. (2007): Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27 (11), S. 2292–2301. DOI: 10.1161/ATVBAHA.107.149179.

Gareus, R.; Kotsaki, E.; Xanthoulea, S.; van der Made, I.; Gijbels, M. J. J.; Kardakaris, R. et al. (2008): Endothelial cell-specific NF-kappaB inhibition protects mice from atherosclerosis. In: *Cell Metab* 8 (5), S. 372–383. DOI: 10.1016/j.cmet.2008.08.016.

Garrido-Urbani, S.; Bradfield, P. F.; Imhof, B. A. (2014): Tight junction dynamics: the role of junctional adhesion molecules (JAMs). In: *Cell Tissue Res* 355 (3), S. 701–715. DOI: 10.1007/s00441-014-1820-1.

Gary Whitlock; Sarah Lewington; Paul Sherliker; Robert Clarke; Jonathan Emberson; Jim Halsey et al. (2009): Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. In: *The Lancet* 373 (9669), S. 1083–1096. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)60318-4.

Gebuhrer, V.; Murphy, J. F.; Bordet, J. C.; Reck, M. P.; McGregor, J. L. (1995): Oxidized low-density lipoprotein induces the expression of P-selectin (GMP140/PADGEM/CD62) on human endothelial cells. In: *Biochem J* 306 (Pt 1), S. 293–298. DOI: 10.1042/bj3060293.

Gelfand, J. M.; Shin, D. B.; Armstrong, A. W.; Tyring, S. K.; Blauvelt, A.; Gottlieb, S. et al. (2022): Association of Apremilast With Vascular Inflammation and Cardiometabolic Function in Patients With Psoriasis: The VIP-A Phase 4, Open-label, Nonrandomized Clinical Trial. In: *JAMA Dermatol* 158 (12), S. 1394–1403. DOI: 10.1001/jamadermatol.2022.3862.

Georgakis, M. K.; van der Laan, S. W.; Asare, Y.; Mekke, J. M.; Haitjema, S.; Schoneveld, A. H. et al. (2021): Monocyte-Chemoattractant Protein-1 Levels in Human

Atherosclerotic Lesions Associate With Plaque Vulnerability. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 41 (6), S. 2038–2048. DOI: 10.1161/ATVBAHA.121.316091.

Gerdes, S.; Pinter, A.; Papavassilis, C.; Reinhardt, M. (2020): Effects of secukinumab on metabolic and liver parameters in plaque psoriasis patients. In: *J Eur Acad Dermatol Venereol* 34 (3), S. 533–541. DOI: 10.1111/jdv.16004.

Gerhardt, S.; König, V.; Doll, M.; Hailemariam-Jahn, T.; Hrgovic, I.; Zöller, N. et al. (2015): Dimethylfumarate protects against TNF- α -induced secretion of inflammatory cytokines in human endothelial cells. In: *J Inflamm (Lond)* 12, S. 49. DOI: 10.1186/s12950-015-0094-z.

Ghosh, M.; Garcia-Castillo, D.; Aguirre, V.; Golshani, R.; Atkins, C. M.; Bramlett, H. M. et al. (2012): Proinflammatory cytokine regulation of cyclic AMP-phosphodiesterase 4 signaling in microglia in vitro and following CNS injury. In: *Glia* 60 (12), S. 1839–1859. DOI: 10.1002/glia.22401.

Gimbrone, M. A.; García-Cardena, G. (2016): Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. In: *Circ Res* 118 (4), S. 620–636. DOI: 10.1161/circresaha.115.306301.

Glovaci, D.; Fan, W.; Wong, N. D. (2019): Epidemiology of Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease. In: *Curr Cardiol Rep* 21 (4), S. 21. DOI: 10.1007/s11886-019-1107-y.

Goldstein, J. L.; Brown, M. S. (1977): Atherosclerosis: The low-density lipoprotein receptor hypothesis. In: *Metabolism* 26 (11), S. 1257–1275. DOI: 10.1016/0026-0495(77)90119-6.

Gonzalez-Cantero, A.; Gonzalez-Cantero, J.; Sanchez-Moya, A. I.; Perez-Hortet, C.; Arias-Santiago, S.; Schoendorff-Ortega, C.; Gonzalez-Calvin, J. L. (2019): Subclinical atherosclerosis in psoriasis. Usefulness of femoral artery ultrasound for the diagnosis, and analysis of its relationship with insulin resistance. In: *PLoS ONE* 14 (2), e0211808. DOI: 10.1371/journal.pone.0211808.

Gottlieb, A. B.; Strober, B.; Krueger, J. G.; Rohane, P.; Zeldis, J. B.; Hu, C. C.; Kipnis, C. (2008): An open-label, single-arm pilot study in patients with severe plaque-type psoriasis treated with an oral anti-inflammatory agent, apremilast. In: *Curr Med Res Opin* 24 (5), S. 1529–1538. DOI: 10.1185/030079908X301866.

Griffin, G. K.; Newton, G.; Tarrío, M. L.; Bu, D.; Maganto-García, E.; Azcutia, V. et al. (2012): IL-17 and TNF- α sustain neutrophil recruitment during inflammation through synergistic effects on endothelial activation. In: *J Immunol* 188 (12), S. 6287–6299. DOI: 10.4049/jimmunol.1200385.

Grober, J. S.; Bowen, B. L.; Ebling, H.; Athey, B.; Thompson, C. B.; Fox, D. A.; Stoolman, L. M. (1993): Monocyte-endothelial adhesion in chronic rheumatoid arthritis. In situ detection of selectin and integrin-dependent interactions. In: *J Clin Invest* 91 (6), S. 2609–2619.

Gu, L.; Okada, Y.; Clinton, S. K.; Gerard, C.; Sukhova, G. K.; Libby, P.; Rollins, B. J. (1998): Absence of Monocyte Chemoattractant Protein-1 Reduces Atherosclerosis in Low Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice. In: *Molecular Cell* 2 (2), S. 275–281. DOI: 10.1016/s1097-2765(00)80139-2.

Gualtierotti, R.; Lucia, O. de (2019): Efficacy and Metabolic Effect on Serum Lipids of Apremilast in Psoriatic Arthritis: A Case Report. In: *J Clin Med* 8 (3). DOI: 10.3390/jcm8030398.

Halcox, J. P. J.; Schenke, W. H.; Zalos, G.; Mincemoyer, R.; Prasad, A.; Waclawiw, M. A. et al. (2002): Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. In: *Circulation* 106 (6), S. 653–658. DOI: 10.1161/01.cir.0000025404.78001.d8.

Hansson, G. K.; Hermansson, A. (2011): The immune system in atherosclerosis. In: *Nat Immunol* 12 (3), S. 204–212. DOI: 10.1038/ni.2001.

Harjunpää, H.; Lloret Asens, M.; Guenther, C.; Fagerholm, S. C. (2019): Cell Adhesion Molecules and Their Roles and Regulation in the Immune and Tumor Microenvironment. In: *Front Immunol* 10, S. 1078. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01078.

Harry, B. L.; Sanders, J. M.; Feaver, R. E.; Lansey, M.; Deem, T. L.; Zarbock, A. et al. (2008): Endothelial cell PECAM-1 promotes atherosclerotic lesions in areas of disturbed flow in ApoE-deficient mice. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28 (11), S. 2003–2008. DOI: 10.1161/ATVBAHA.108.164707.

Heidenreich, R.; Röcken, M.; Ghoreschi, K. (2009): Angiogenesis drives psoriasis pathogenesis. In: *Int J Exp Pathol* 90 (3), S. 232–248. DOI: 10.1111/j.1365-2613.2009.00669.x.

Heller, E. A.; Liu, E.; Tager, A. M.; Yuan, Q.; Lin, A. Y.; Ahluwalia, N. et al. (2006): Chemokine CXCL10 promotes atherogenesis by modulating the local balance of effector and regulatory T cells. In: *Circulation* 113 (19), S. 2301–2312. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.605121.

Heness, S.; Johnson, C. K.; Ge, Q.; Armour, C. L.; Hughes, J. M.; Ammit, A. J. (2004): IL-17A augments TNF-alpha-induced IL-6 expression in airway smooth muscle by enhancing mRNA stability. In: *J Allergy Clin Immunol* 114 (4), S. 958–964. DOI: 10.1016/j.jaci.2004.06.023.

Henriksen, T.; Mahoney, E. M.; Steinberg, D. (1983): Enhanced macrophage degradation of biologically modified low density lipoprotein. In: *Arteriosclerosis* 3 (2), S. 149–159. DOI: 10.1161/01.ATV.3.2.149.

Hillyer, P.; Mordelet, E.; Flynn, G.; Male, D. (2003): Chemokines, chemokine receptors and adhesion molecules on different human endothelia: discriminating the tissue-specific functions that affect leucocyte migration. In: *Clin Exp Immunol* 134 (3), S. 431–441. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2003.02323.x.

Hiraoka, M.; Nitta, N.; Nagai, M.; Shimokado, K.; Yoshida, M. (2004): MCP-1-induced enhancement of THP-1 adhesion to vascular endothelium was modulated by HMG-CoA reductase inhibitor through RhoA GTPase-, but not ERK1/2-dependent pathway. In: *Life Sci* 75 (11), S. 1333–1341. DOI: 10.1016/j.lfs.2004.02.028.

Hodgson, J. (1815): *Treatise on the Diseases of Arteries and Veins, Containing the Pathology and Treatment of Aneurisms and Wounded Arteries.*
<https://archive.org/details/b21299870/page/10/mode/2up> External identifier:
urn:oclc:record:970768879. In: Thomas Underwood.

Hoesel, B.; Schmid, J. A. (2013): The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer. In: *Mol Cancer* 12, S. 86. DOI: 10.1186/1476-4598-12-86.

Honda, K.; Wada, H.; Nakamura, M.; Nakamoto, K.; Inui, T.; Sada, M. et al. (2016): IL-17A synergistically stimulates TNF-α-induced IL-8 production in human airway epithelial cells: A potential role in amplifying airway inflammation. In: *Exp Lung Res* 42 (4), S. 205–216. DOI: 10.1080/01902148.2016.1190796.

Hrgovic, I.; Doll, M.; Kleemann, J.; Wang, X.-F.; Zoeller, N.; Pinter, A. et al. (2016): The histone deacetylase inhibitor trichostatin a decreases lymphangiogenesis by

inducing apoptosis and cell cycle arrest via p21-dependent pathways. In: *BMC Cancer* 16 (1), S. 763. DOI: 10.1186/s12885-016-2807-y.

Huo, Y.; Hafezi-Moghadam, A.; Ley, K. (2000): Role of vascular cell adhesion molecule-1 and fibronectin connecting segment-1 in monocyte rolling and adhesion on early atherosclerotic lesions. In: *Circ Res* 87 (2), S. 153–159. DOI: 10.1161/01.RES.87.2.153.

Imam, F.; Al-Harbi, N. O.; Al-Harbi, M. M.; Ansari, M. A.; Al-Asmari, A. F.; Ansari, M. N. et al. (2018): Apremilast prevent doxorubicin-induced apoptosis and inflammation in heart through inhibition of oxidative stress mediated activation of NF- κ B signaling pathways. In: *Pharmacological Reports* 70 (5), S. 993–1000. DOI: 10.1016/j.pharep.2018.03.009.

Irrera, N.; Vaccaro, M.; Bitto, A.; Pallio, G.; Pizzino, G.; Lentini, M. et al. (2017): BAY 11-7082 inhibits the NF- κ B and NLRP3 inflammasome pathways and protects against IMQ-induced psoriasis. In: *Clin Sci (Lond)* 131 (6), S. 487–498. DOI: 10.1042/cs20160645.

Itabe, H.; Mori, M.; Fujimoto, Y.; Higashi, Y.; Takano, T. (2003): Minimally modified LDL is an oxidized LDL enriched with oxidized phosphatidylcholines. In: *J Biochem* 134 (3), S. 459–465. DOI: 10.1093/jb/mvg164.

Itoh, C. Y.; Gunnarsson, C.; Babunovic, G. H.; Nibasumba, A.; Akilimali, N. A.; Wadsworth, M. H. et al. (2020): GM-CSF differentiation of human monocytes stabilizes macrophage state via oxidative signaling.

Iyoda, M.; Shibata, T.; Kawaguchi, M.; Hizawa, N.; Yamaoka, T.; Kokubu, F.; Akizawa, T. (2010): IL-17A and IL-17F stimulate chemokines via MAPK pathways (ERK1/2 and p38 but not JNK) in mouse cultured mesangial cells: synergy with TNF- α and IL-1 β . In: *Am J Physiol Renal Physiol* 298 (3), F779-87. DOI: 10.1152/ajprenal.00198.2009.

Jacobs, M. D.; Harrison, S. C. (1998): Structure of an I κ B α /NF- κ B Complex. In: *Cell* 95 (6), S. 749–758. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81698-0.

Janeway, C. A.; Medzhitov, R. (2002): Innate immune recognition. In: *Annu Rev Immunol* 20, S. 197–216. DOI: 10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359.

Jeon, C.; Sekhon, S.; Di Yan; Afifi, L.; Nakamura, M.; Bhutani, T. (2017): Monoclonal antibodies inhibiting IL-12, -23, and -17 for the treatment of psoriasis. In: *Hum Vaccin Immunother* 13 (10), S. 2247–2259. DOI: 10.1080/21645515.2017.1356498.

Jin, Z.-X.; Xiong, Q.; Jia, F.; Sun, C.-L.; Zhu, H.-T.; Ke, F.-S. (2015): Investigation of RNA interference suppression of matrix metalloproteinase-9 in mouse model of atherosclerosis. In: *Int J Clin Exp Med* 8 (4), S. 5272–5278.

Johnson, C.; Galis, Z. S. (2004): Matrix metalloproteinase-2 and -9 differentially regulate smooth muscle cell migration and cell-mediated collagen organization. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24 (1), S. 54–60. DOI: 10.1161/01.ATV.0000100402.69997.C3.

Johnson, J. L.; George, S. J.; Newby, A. C.; Jackson, C. L. (2005): Divergent effects of matrix metalloproteinases 3, 7, 9, and 12 on atherosclerotic plaque stability in mouse brachiocephalic arteries. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (43), S. 15575–15580. DOI: 10.1073/pnas.0506201102.

Johnson-Tidey, R. R.; McGregor, J. L.; Taylor, P. R.; Poston, R. N. (1994): Increase in the adhesion molecule P-selectin in endothelium overlying atherosclerotic plaques. Coexpression with intercellular adhesion molecule-1. In: *Am J Pathol* 144 (5), S. 952–961.

Johnston, L. A.; Erdogan, S.; Cheung, Y. F.; Sullivan, M.; Barber, R.; Lynch, M. J. et al. (2004): Expression, intracellular distribution and basis for lack of catalytic activity of the PDE4A7 isoform encoded by the human PDE4A cAMP-specific phosphodiesterase gene. In: *Biochem J* 380 (Pt 2), S. 371–384. DOI: 10.1042/bj20031662.

Jones, N. A.; Boswell-Smith, V.; Lever, R.; Page, C. P. (2005): The effect of selective phosphodiesterase isoenzyme inhibition on neutrophil function in vitro. In: *Pulm Pharmacol Ther* 18 (2), S. 93–101. DOI: 10.1016/j.pupt.2004.10.001.

Karin, N.; Razon, H. (2018): Chemokines beyond chemo-attraction: CXCL10 and its significant role in cancer and autoimmunity. In: *Cytokine* 109, S. 24–28. DOI: 10.1016/j.cyto.2018.02.012.

Kataoka, S.; Takaishi, M.; Nakajima, K.; Sano, S. (2020): Phosphodiesterase-4 inhibitors reduce the expression of proinflammatory mediators by human epidermal

keratinocytes independent of intracellular cAMP elevation. In: *J Dermatol Sci* 100 (3), S. 230–233. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2020.09.014.

Kim, D. S.; Kim, M.-S.; Kang, S.-W.; Sung, H.-Y.; Kang, Y.-H. (2010): Pine bark extract enzogenol attenuated tumor necrosis factor-alpha-induced endothelial cell adhesion and monocyte transmigration. In: *J Agric Food Chem* 58 (11), S. 7088–7095. DOI: 10.1021/jf1005287.

Knöbl, P. (2006): DFP-Allgemeinmedizin: Blutgerinnung. Online verfügbar unter <https://web.archive.org/web/20070928051827/http://www.medizin-medien.info/dynasite.cfm?dssid=4169&dsmid=75955&dspaid=591493>.

Koga, Y.; Hisada, T.; Ishizuka, T.; Utsugi, M.; Ono, A.; Yatomi, M. et al. (2016): CREB regulates TNF- α -induced GM-CSF secretion via p38 MAPK in human lung fibroblasts. In: *Allergol Int* 65 (4), S. 406–413. DOI: 10.1016/j.alit.2016.03.006.

Kojima, C.; Ino, J.; Ishii, H.; Nitta, K.; Yoshida, M. (2010): MMP-9 inhibition by ACE inhibitor reduces oxidized LDL-mediated foam-cell formation. In: *J Atheroscler Thromb* 17 (1), S. 97–105. DOI: 10.5551/jat.1685.

Korzeniewski, C.; Callewaert, D. M. (1983): An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. In: *Journal of Immunological Methods* 64 (3), S. 313–320. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90438-6.

Kronenberg, F.; Kronenberg, M. F.; Kiechl, S.; Trenkwalder, E.; Santer, P.; Oberhollenzer, F. et al. (1999): Role of lipoprotein(a) and apolipoprotein(a) phenotype in atherogenesis: prospective results from the Bruneck study. In: *Circulation* 100 (11), S. 1154–1160. DOI: 10.1161/01.cir.100.11.1154.

Kubes, P.; Suzuki, M.; Granger, D. N. (1991): Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (11), S. 4651–4655. DOI: 10.1073/pnas.88.11.4651.

Kwak, H. J.; Song, J. S.; Heo, J. Y.; Yang, S. D.; Nam, J.-Y.; Cheon, H. G. (2005): Roflumilast inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory mediators via suppression of nuclear factor-kappaB, p38 mitogen-activated protein kinase, and c-Jun NH2-terminal kinase activation. In: *J Pharmacol Exp Ther* 315 (3), S. 1188–1195. DOI: 10.1124/jpet.105.092056.

Kyriakis, J. M.; Avruch, J. (2001): Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. In: *Physiol Rev* 81 (2), S. 807–869. DOI: 10.1152/physrev.2001.81.2.807.

Lande, R.; Gregorio, J.; Facchinetti, V.; Chatterjee, B.; Wang, Y.-H.; Homey, B. et al. (2007): Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. In: *Nature* 449 (7162), S. 564–569. DOI: 10.1038/nature06116.

Laviola, L.; Orlando, M. R.; Incalza, M. A.; Caccioppoli, C.; Melchiorre, M.; Leonardini, A. et al. (2013): TNF α signals via p66(Shc) to induce E-Selectin, promote leukocyte transmigration and enhance permeability in human endothelial cells. In: *PLoS ONE* 8 (12), e81930. DOI: 10.1371/journal.pone.0081930.

Lawrence, T. (2009): The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. In: *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1 (6), a001651. DOI: 10.1101/cshperspect.a001651.

Layseca-Espinosa, E.; Baranda, L.; Alvarado-Sánchez, B.; Portales-Pérez, D.; Portillo-Salazar, H.; González-Amaro, R. (2003): Rolipram inhibits polarization and migration of human T lymphocytes. In: *J Invest Dermatol* 121 (1), S. 81–87. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2003.12301.x.

Liang, J.; Zhuang, R.; Sun, X.; Zhang, F.; Zou, B. (2021): Apremilast mitigates interleukin (IL)-13-induced inflammatory response and mucin production in human nasal epithelial cells (hNECs). In: *Bioengineered* 12 (1), S. 8583–8593. DOI: 10.1080/21655979.2021.1987818.

Libby, P.; Buring, J. E.; Badimon, L.; Hansson, G. K.; Deanfield, J.; Bittencourt, M. S. et al. (2019): Atherosclerosis. In: *Nat Rev Dis Primers* 5 (1), S. 56. DOI: 10.1038/s41572-019-0106-z.

Liu, J.; Liu, W.; Xie, Y.; Wang, Y.; Ouyang, X. (2015): Adhesion of monocytes to periodontal fibroblasts requires activation of NOD1/2- and TLR4-mediated LFA-1 and VLA-4. In: *Arch Oral Biol* 60 (6), S. 834–844. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2014.12.012.

Lizzul, P. F.; Aphale, A.; Malaviya, R.; Sun, Y.; Masud, S.; Dombrovskiy, V.; Gottlieb, A. B. (2005): Differential expression of phosphorylated NF-kappaB/RelA in normal and psoriatic epidermis and downregulation of NF-kappaB in response to treatment with etanercept. In: *J Invest Dermatol* 124 (6), S. 1275–1283. DOI: 10.1111/j.0022-202x.2005.23735.x.

- Lomas, O.; Zaccolo, M. (2014): Phosphodiesterases maintain signaling fidelity via compartmentalization of cyclic nucleotides. In: *Physiology (Bethesda)* 29 (2), S. 141–149. DOI: 10.1152/physiol.00040.2013.
- Lottspeich, Friedrich; Engels, Joachim W. (Hg.) (2009): Bioanalytik. 2., [aktualisierte und erw.] Aufl., [Nachdr.]. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.
- Lou, J.; Chofflon, M.; Juillard, C.; Donati, Y.; Mili, N.; Siegrist, C. A.; Grau, G. E. (1997): Brain microvascular endothelial cells and leukocytes derived from patients with multiple sclerosis exhibit increased adhesion capacity. In: *Neuroreport* 8 (3), S. 629–633. DOI: 10.1097/00001756-199702100-00010.
- Lowry, O.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. In: *J Biol Chem* 193 (1), S. 265–275.
- Ludmer, P. L.; Selwyn, A. P.; Shook, T. L.; Wayne, R. R.; Mudge, G. H.; Alexander, R. W.; Ganz, P. (1986): Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. In: *N Engl J Med* 315 (17), S. 1046–1051. DOI: 10.1056/nejm198610233151702.
- Lugnier, C. (2006): Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. In: *Pharmacol Ther* 109 (3), S. 366–398. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2005.07.003.
- Luo, J.; Yang, L.; Yang, J.; Yang, D.; Liu, B.-C.; Liu, D. et al. (2018): Efficacy and safety of phosphodiesterase 4 inhibitors in patients with asthma: A systematic review and meta-analysis. In: *Respirology* 23 (5), S. 467–477. DOI: 10.1111/resp.13276.
- Luttun, A.; Lutgens, E.; Manderveld, A.; Maris, K.; Collen, D.; Carmeliet, P.; Moons, L. (2004): Loss of matrix metalloproteinase-9 or matrix metalloproteinase-12 protects apolipoprotein E-deficient mice against atherosclerotic media destruction but differentially affects plaque growth. In: *Circulation* 109 (11), S. 1408–1414. DOI: 10.1161/01.cir.0000121728.14930.de.
- Mackenzie, S. J.; Houslay, M. D. (2000): Action of rolipram on specific PDE4 cAMP phosphodiesterase isoforms and on the phosphorylation of cAMP-response-element-binding protein (CREB) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase in U937 monocytic cells. In: *Biochemical Journal* 347 (2), S. 571–578. DOI: 10.1042/bj3470571.

- Man, H.-W.; Schafer, P.; Wong, L. M.; Patterson, R. T.; Corral, L. G.; Raymon, H. et al. (2009): Discovery of (S)-N-2-1-(3-ethoxy-4-methoxyphenyl)-2-methanesulfonylethyl-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-isindol-4-yl acetamide (apremilast), a potent and orally active phosphodiesterase 4 and tumor necrosis factor-alpha inhibitor. In: *J Med Chem* 52 (6), S. 1522–1524. DOI: 10.1021/jm900210d.
- Mandell, K. J.; Parkos, C. A. (2005): The JAM family of proteins. In: *Adv Drug Deliv Rev* 57 (6), S. 857–867. DOI: 10.1016/j.addr.2005.01.005.
- Manka, D.; Collins, R. G.; Ley, K.; Beaudet, A. L.; Sarembock, I. J. (2001): Absence of p-selectin, but not intercellular adhesion molecule-1, attenuates neointimal growth after arterial injury in apolipoprotein e-deficient mice. In: *Circulation* 103 (7), S. 1000–1005. DOI: 10.1161/01.cir.103.7.1000.
- Martin-Padura, I.; Lostaglio, S.; Schneemann, M.; Williams, L.; Romano, M.; Fruscella, P. et al. (1998): Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. In: *J Cell Biol* 142 (1), S. 117–127. DOI: 10.1083/jcb.142.1.117.
- Mason, D. P.; Kenagy, R. D.; Hasenstab, D.; Bowen-Pope, D. F.; Seifert, R. A.; Coats, S. et al. (1999): Matrix metalloproteinase-9 overexpression enhances vascular smooth muscle cell migration and alters remodeling in the injured rat carotid artery. In: *Circ Res* 85 (12), S. 1179–1185. DOI: 10.1161/01.res.85.12.1179.
- Massimi, M.; Cardarelli, S.; Galli, F.; Giardi, M. F.; Ragusa, F.; Panera, N. et al. (2017): Increase of Intracellular Cyclic AMP by PDE4 Inhibitors Affects HepG2 Cell Cycle Progression and Survival. In: *J Cell Biochem* 118 (6), S. 1401–1411. DOI: 10.1002/jcb.25798.
- Mauersberger, C.; Hinterdobler, J.; Schunkert, H.; Kessler, T.; Sager, H. B. (2021): Where the Action Is-Leukocyte Recruitment in Atherosclerosis. In: *Front Cardiovasc Med* 8, S. 813984. DOI: 10.3389/fcvm.2021.813984.
- McCann, F. E.; Palfreeman, A. C.; Andrews, M.; Perocheau, D. P.; Inglis, J. J.; Schafer, P. et al. (2010): Apremilast, a novel PDE4 inhibitor, inhibits spontaneous production of tumour necrosis factor-alpha from human rheumatoid synovial cells and ameliorates experimental arthritis. In: *Arthritis Res Ther* 12 (3), R107. DOI: 10.1186/ar3041.

McLaren, J. E.; Michael, D. R.; Ashlin, T. G.; Ramji, D. P. (2011): Cytokines, macrophage lipid metabolism and foam cells: implications for cardiovascular disease therapy. In: *Prog Lipid Res* 50 (4), S. 331–347. DOI: 10.1016/j.plipres.2011.04.002.

Mehta, N. N.; Shin, D. B.; Joshi, A. A.; Dey, A. K.; Armstrong, A. W.; Duffin, K. C. et al. (2018): Effect of 2 Psoriasis Treatments on Vascular Inflammation and Novel Inflammatory Cardiovascular Biomarkers: A Randomized Placebo-Controlled Trial. In: *Circ Cardiovasc Imaging* 11 (6), e007394. DOI: 10.1161/CIRCIMAGING.117.007394.

Metcalf, D. (2008): Hematopoietic cytokines. In: *Blood* 111 (2), S. 485–491. DOI: 10.1182/blood-2007-03-079681.

Michalek, I. M.; Loring, B.; John, S. M. (2017): A systematic review of worldwide epidemiology of psoriasis. In: *J Eur Acad Dermatol Venereol* 31 (2), S. 205–212. DOI: 10.1111/jdv.13854.

Miossec, P.; Kolls, J. K. (2012): Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. In: *Nat Rev Drug Discov* 11 (10), S. 763–776. DOI: 10.1038/nrd3794.

Montanari, E.; Stojkovic, S.; Kaun, C.; Lemberger, C. E.; Martin, R. de; Rauscher, S. et al. (2016): Interleukin-33 stimulates GM-CSF and M-CSF production by human endothelial cells. In: *Thromb Haemost* 116 (2), S. 317–327. DOI: 10.1160/TH15-12-0917.

Moore, G. E. (1967): Culture of Normal Human Leukocytes. In: *JAMA* 199 (8), S. 519. DOI: 10.1001/jama.1967.03120080053007.

Moore, K. J.; Freeman, M. W. (2006): Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26 (8), S. 1702–1711. DOI: 10.1161/01.ATV.0000229218.97976.43.

Morandini, R.; Ghanem, G.; Portier-Lemarié, A.; Robaye, B.; Renaud, A.; Boeynaems, J. M. (1996): Action of cAMP on expression and release of adhesion molecules in human endothelial cells. In: *Am J Physiol* 270 (3 Pt 2), H807-16. DOI: 10.1152/ajpheart.1996.270.3.H807.

Mulero, M. C.; Huxford, T.; Ghosh, G. (2019): NF- κ B, I κ B, and IKK: Integral Components of Immune System Signaling. In: *Adv Exp Med Biol* 1172, S. 207–226. DOI: 10.1007/978-981-13-9367-9_10.

Muller, G. W.; Corral, L. G.; Shire, M. G.; Wang, H.; Moreira, A.; Kaplan, G.; Stirling, D. I. (1996): Structural modifications of thalidomide produce analogs with enhanced tumor necrosis factor inhibitory activity. In: *J Med Chem* 39 (17), S. 3238–3240. DOI: 10.1021/jm9603328.

Muller, G. W.; Shire, M. G.; Wong, L. M.; Corral, L. G.; Patterson, R. T.; Chen, Y.; Stirling, D. I. (1998): Thalidomide analogs and PDE4 inhibition. In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 8 (19), S. 2669–2674. DOI: 10.1016/s0960-894x(98)00475-2.

Muller, W. A. (2003): Leukocyte–endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. In: *Trends in Immunology* 24 (6), S. 326–333. DOI: 10.1016/s1471-4906(03)00117-0.

Muller, W. A.; Weigl, S. A.; Deng, X.; Phillips, D. M. (1993): PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. In: *J Exp Med* 178 (2), S. 449–460. DOI: 10.1084/jem.178.2.449.

Munoz, C.; Pascual-Salcedo, D.; Castellanos, M. C.; Alfranca, A.; Aragonés, J.; Vara, A. et al. (1996): Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits the production of interleukin-6, interleukin-8, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by human endothelial cells in response to inflammatory mediators: modulation of NF-kappa B and AP-1 transcription factors activity. In: *Blood* 88 (9), S. 3482–3490. DOI: 10.1182/blood.V88.9.3482.bloodjournal18893482.

Mussbacher, M.; Salzmann, M.; Brostjan, C.; Hoesel, B.; Schoergenhofer, C.; Datler, H. et al. (2019): Cell Type-Specific Roles of NF-κB Linking Inflammation and Thrombosis. In: *Front Immunol* 10, S. 85. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00085.

National Center for Biotechnology Information (NCBI) ([1988] – [zitiert 2024]): Primer-BLAST: National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Nestle, F. O.; Conrad, C.; Tun-Kyi, A.; Homey, B.; Gombert, M.; Boyman, O. et al. (2005): Plasmacytoid dendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. In: *J Exp Med* 202 (1), S. 135–143. DOI: 10.1084/jem.20050500.

Neumann, M.; Grieshammer, T.; Chuvpilo, S.; Kneitz, B.; Lohoff, M.; Schimpl, A. et al. (1995): RelA/p65 is a molecular target for the immunosuppressive action of protein

kinase A. In: *EMBO J* 14 (9), S. 1991–2004. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb07191.x.

Newton, R.; King, E. M.; Gong, W.; Rider, C. F.; Staples, K. J.; Holden, N. S.; Bergmann, M. W. (2010): Glucocorticoids inhibit IL-1beta-induced GM-CSF expression at multiple levels: roles for the ERK pathway and repression by MKP-1. In: *Biochem J* 427 (1), S. 113–124. DOI: 10.1042/BJ20091038.

Nguyen, M. T.; Fernando, S.; Schwarz, N.; Tan, J. T.; Bursill, C. A.; Psaltis, P. J. (2019): Inflammation as a Therapeutic Target in Atherosclerosis. In: *J Clin Med* 8 (8). DOI: 10.3390/jcm8081109.

Nizamutdinova, I. T.; Kim, Y. M.; Lee, J. H.; Chang, K. C.; Kim, H. J. (2012): MKP-7, a negative regulator of JNK, regulates VCAM-1 expression through IRF-1. In: *Cell Signal* 24 (4), S. 866–872. DOI: 10.1016/j.cellsig.2011.12.002.

Ogawa, E.; Sato, Y.; Minagawa, A.; Okuyama, R. (2018): Pathogenesis of psoriasis and development of treatment. In: *J Dermatol* 45 (3), S. 264–272. DOI: 10.1111/1346-8138.14139.

Oltmanns, U.; Issa, R.; Sukkar, M. B.; John, M.; Chung, K. F. (2003): Role of c-jun N-terminal kinase in the induced release of GM-CSF, RANTES and IL-8 from human airway smooth muscle cells. In: *Br J Pharmacol* 139 (6), S. 1228–1234. DOI: 10.1038/sj.bjp.0705345.

Ostermann, G.; Weber, K. S. C.; Zernecke, A.; Schröder, A.; Weber, C. (2002): JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. In: *Nat Immunol* 3 (2), S. 151–158. DOI: 10.1038/ni755.

Ou, H.-C.; Lee, W.-J.; Lee, I.-T.; Chiu, T.-H.; Tsai, K.-L.; Lin, C.-Y.; Sheu, W. H.-H. (2009): Ginkgo biloba extract attenuates oxLDL-induced oxidative functional damages in endothelial cells. In: *J Appl Physiol* 106 (5), S. 1674–1685. DOI: 10.1152/jappphysiol.91415.2008.

Ovcina-Kurtovic, N.; Kasumagic-Halilovic, E. (2022): Serum Levels of Tumor Necrosis Factor - alpha in Patients With Psoriasis. In: *Mater Sociomed* 34 (1), S. 40–43. DOI: 10.5455/msm.2022.33.40-43.

Ozaki, H.; Ishii, K.; Horiuchi, H.; Arai, H.; Kawamoto, T.; Okawa, K. et al. (1999): Cutting edge: combined treatment of TNF-alpha and IFN-gamma causes redistribution

of junctional adhesion molecule in human endothelial cells. In: *J Immunol* 163 (2), S. 553–557.

Pan, W.; Yu, H.; Huang, S.; Zhu, P. (2016): Resveratrol Protects against TNF- α -Induced Injury in Human Umbilical Endothelial Cells through Promoting Sirtuin-1-Induced Repression of NF-KB and p38 MAPK. In: *PLoS ONE* 11 (1), e0147034. DOI: 10.1371/journal.pone.0147034.

Papp, K.; Cather, J. C.; Rosoph, L.; Sofen, H.; Langley, R. G.; Matheson, R. T. et al. (2012): Efficacy of apremilast in the treatment of moderate to severe psoriasis: a randomised controlled trial. In: *The Lancet* 380 (9843), S. 738–746. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)60642-4.

Papp, K.; Reich, K.; Leonardi, C. L.; Kircik, L.; Chimenti, S.; Langley, R. G. B. et al. (2015): Apremilast, an oral phosphodiesterase 4 (PDE4) inhibitor, in patients with moderate to severe plaque psoriasis: Results of a phase III, randomized, controlled trial (Efficacy and Safety Trial Evaluating the Effects of Apremilast in Psoriasis ESTEEM 1). In: *J Am Acad Dermatol* 73 (1), S. 37–49. DOI: 10.1016/j.jaad.2015.03.049.

Parisi, R.; Symmons, D. P. M.; Griffiths, C. E. M.; Ashcroft, D. M. (2013): Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence. In: *J Invest Dermatol* 133 (2), S. 377–385. DOI: 10.1038/jid.2012.339.

Park, H.-J.; Zhang, Y.; Georgescu, S. P.; Johnson, K. L.; Kong, D.; Galper, J. B. (2006): Human umbilical vein endothelial cells and human dermal microvascular endothelial cells offer new insights into the relationship between lipid metabolism and angiogenesis. HUVEC als allgemein anerkannte Zelllinie zur Untersuchung von endothelialen Zellen. In: *Stem Cell Rev* 2 (2), S. 93–102. DOI: 10.1007/s12015-006-0015-x.

Patel, S. S.; Thiagarajan, R.; Willerson, J. T.; Yeh, E. T. (1998): Inhibition of alpha4 integrin and ICAM-1 markedly attenuate macrophage homing to atherosclerotic plaques in ApoE-deficient mice. In: *Circulation* 97 (1), S. 75–81. DOI: 10.1161/01.CIR.97.1.75.

Paul, C.; Cather, J.; Gooderham, M.; Poulin, Y.; Mrowietz, U.; Ferrandiz, C. et al. (2015): Efficacy and safety of apremilast, an oral phosphodiesterase 4 inhibitor, in patients with moderate-to-severe plaque psoriasis over 52 weeks: a phase III, randomized controlled trial (ESTEEM 2). In: *Br J Dermatol* 173 (6), S. 1387–1399. DOI: 10.1111/bjd.14164.

Pearson, J. D. (2000): Normal endothelial cell function. In: *Lupus* 9 (3), S. 183–188. DOI: 10.1191/096120300678828299.

Pentikäinen, M. O.; Oörni, K.; Ala-Korpela, M.; Kovanen, P. T. (2000): Modified LDL - trigger of atherosclerosis and inflammation in the arterial intima. In: *J Intern Med* 247 (3), S. 359–370. DOI: 10.1046/j.1365-2796.2000.00655.x.

Pietersma, A.; Tilly, B. C.; Gaestel, M.; Jong, N. de; Lee, J. C.; Koster, J. F.; Sluiter, W. (1997): p38 mitogen activated protein kinase regulates endothelial VCAM-1 expression at the post-transcriptional level. cAMP hoch --> inhibiert p38 --> sorgt für geringere Translokation von p65. In: *Biochem Biophys Res Commun* 230 (1), S. 44–48. DOI: 10.1006/bbrc.1996.5886.

Pober, J. S.; Slowik, M. R.; Luca, L. G. de; Ritchie, A. J. (1993): Elevated cyclic AMP inhibits endothelial cell synthesis and expression of TNF-induced endothelial leukocyte adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1, but not intercellular adhesion molecule-1. In: *J Immunol* 150 (11), S. 5114–5123.

Qin, Z. (2012): The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. In: *Atherosclerosis* 221 (1), S. 2–11. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.09.003.

Rahman, A.; Anwar, K. N.; Minhajuddin, M.; Bijli, K. M.; Javaid, K.; True, A. L.; Malik, A. B. (2004): cAMP targeting of p38 MAP kinase inhibits thrombin-induced NF-kappaB activation and ICAM-1 expression in endothelial cells. In: *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287 (5), L1017-24. DOI: 10.1152/ajplung.00072.2004.

Ramos, C. L.; Huo, Y.; Jung, U.; Ghosh, S.; Manka, D. R.; Sarembock, I. J.; Ley, K. (1999): Direct demonstration of P-selectin- and VCAM-1-dependent mononuclear cell rolling in early atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice. In: *Circ Res* 84 (11), S. 1237–1244. DOI: 10.1161/01.res.84.11.1237.

Ray, M.; Autieri, M. V. (2017): Regulation of Pro-and Anti-atherogenic Cytokines. In: *Cytokine* 122, S. 154175. DOI: 10.1016/j.cyto.2017.09.031.

Read, M. A.; Neish, A. S.; Luscinskas, F. W.; Palombella, V. J.; Maniatis, T.; Collins, T. (1995): The proteasome pathway is required for cytokine-induced endothelial-leukocyte adhesion molecule expression. In: *Immunity* 2 (5), S. 493–506. DOI: 10.1016/1074-7613(95)90030-6.

- Rees, D. D.; Palmer, R. M.; Moncada, S. (1989): Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 86 (9), S. 3375–3378. DOI: 10.1073/pnas.86.9.3375.
- Reeves, M. L.; Leigh, B. K.; England, P. J. (1987): The identification of a new cyclic nucleotide phosphodiesterase activity in human and guinea-pig cardiac ventricle. Implications for the mechanism of action of selective phosphodiesterase inhibitors. In: *Biochem J* 241 (2), S. 535–541. DOI: 10.1042/bj2410535.
- Ren, Z.; Wang, L.; Cui, J.; Huoc, Z.; Xue, J.; Cui, H. et al. (2013): Resveratrol inhibits NF-kB signaling through suppression of p65 and IkappaB kinase activities. In: *Pharmazie* 68 (8), S. 689–694.
- Rendon, A.; Schäkel, K. (2019): Psoriasis Pathogenesis and Treatment. In: *Int J Mol Sci* 20 (6). DOI: 10.3390/ijms20061475.
- Rissanen, A. M. (1979): Familial aggregation of coronary heart disease in a high incidence area (North Karelia, Finland). In: *Br Heart J* 42 (3), S. 294–303. DOI: 10.1136/hrt.42.3.294.
- Rodríguez, D.; Morrison, C. J.; Overall, C. M. (2010): Matrix metalloproteinases: what do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. In: *Biochim Biophys Acta* 1803 (1), S. 39–54. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2009.09.015.
- Rodríguez-Zúñiga, M. J. M.; García-Perdomo, H. A. (2017): Systematic review and meta-analysis of the association between psoriasis and metabolic syndrome. In: *J Am Acad Dermatol* 77 (4), 657-666.e8. DOI: 10.1016/j.jaad.2017.04.1133.
- Romer, L. H.; McLean, N. V.; Yan, H. C.; Daise, M.; Sun, J.; DeLisser, H. M. (1995): IFN-gamma and TNF-alpha induce redistribution of PECAM-1 (CD31) on human endothelial cells. In: *J Immunol* 154 (12), S. 6582–6592.
- Ronald, J. A.; Ionescu, C. V.; Rogers, K. A.; Sandig, M. (2001): Differential regulation of transendothelial migration of THP-1 cells by ICAM-1/LFA-1 and VCAM-1/VLA-4. In: *J Leukoc Biol* 70 (4), S. 601–609.
- Ross, R.; Glomset, J. A. (1973): Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of

- atherosclerosis. In: *Science* 180 (4093), S. 1332–1339. DOI: 10.1126/science.180.4093.1332.
- Ross, R.; Glomset, J. A. (1976): The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). In: *N Engl J Med* 295 (7), S. 369–377. DOI: 10.1056/NEJM197608122950707.
- Roussel, L.; Houle, F.; Chan, C.; Yao, Y.; Bérubé, J.; Olivenstein, R. et al. (2010): IL-17 promotes p38 MAPK-dependent endothelial activation enhancing neutrophil recruitment to sites of inflammation. In: *J Immunol* 184 (8), S. 4531–4537. DOI: 10.4049/jimmunol.0903162.
- Rozenberg, I.; Sluka, S. H. M.; Mocharla, P.; Hallenberg, A.; Rotzius, P.; Borén, J. et al. (2011): Deletion of L-Selectin Increases Atherosclerosis Development in ApoE^{-/-} Mice. In: *PLoS ONE* 6 (7). DOI: 10.1371/journal.pone.0021675.
- Saklayen, M. G. (2018): The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. In: *Curr Hypertens Rep* 20 (2), S. 12. DOI: 10.1007/s11906-018-0812-z.
- Sánchez, A. J.; Puerta, C.; Ballester, S.; González, P.; Arriaga, A.; García-Merino, A. (2005): Rolipram impairs NF-kappaB activity and MMP-9 expression in experimental autoimmune encephalomyelitis. In: *J Neuroimmunol* 168 (1-2), S. 13–20. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2005.03.024.
- Sander, M. (2018): S3-Leitlinie zur intensivmedizinischen Versorgung herzchirurgischer Patienten. Häodynamisches Monitoring und Herz-Kreislauf. Hg. v. Deutsche Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin e.V., Deutsche Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie e.V. AWMF. Online verfügbar unter https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/001-0161_S3_Intensivmedizinische_Versorgung-Haemodynamisches-Monitoring_2018-06.pdf, zuletzt aktualisiert am 08.06.2018.
- Sanz, M.-J.; Cortijo, J.; Taha, M. A.; Cerdá-Nicolás, M.; Schatton, E.; Burgbacher, B. et al. (2007): Roflumilast inhibits leukocyte-endothelial cell interactions, expression of adhesion molecules and microvascular permeability. In: *Br J Pharmacol* 152 (4), S. 481–492. DOI: 10.1038/sj.bjp.0707428.
- Saraceno, R.; Schipani, C.; Mazzotta, A.; Esposito, M.; Di Renzo, L.; Lorenzo, A. de; Chimenti, S. (2008): Effect of anti-tumor necrosis factor-alpha therapies on body mass

index in patients with psoriasis. In: *Pharmacol Res* 57 (4), S. 290–295. DOI: 10.1016/j.phrs.2008.02.006.

Schafer, P. H.; Parton, A.; Capone, L.; Cedzik, D.; Brady, H.; Evans, J. F. et al. (2014): Apremilast is a selective PDE4 inhibitor with regulatory effects on innate immunity. In: *Cell Signal* 26 (9), S. 2016–2029. DOI: 10.1016/j.cellsig.2014.05.014.

Schafer, P. H.; Parton, A.; Gandhi, A. K.; Capone, L.; Adams, M.; Wu, L. et al. (2010): Apremilast, a cAMP phosphodiesterase-4 inhibitor, demonstrates anti-inflammatory activity in vitro and in a model of psoriasis. In: *Br J Pharmacol* 159 (4), S. 842–855. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2009.00559.x.

Schmid, J. A.; Birbach, A. (2008): I κ B kinase beta (IKK β /IKK2/I κ BK β)--a key molecule in signaling to the transcription factor NF- κ B. In: *Cytokine Growth Factor Rev* 19 (2), S. 157–165. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2008.01.006.

Schmitt, M. M. N.; Fraemohs, L.; Hackeng, T. M.; Weber, C.; Koenen, R. R. (2014): Atherogenic mononuclear cell recruitment is facilitated by oxidized lipoprotein-induced endothelial junctional adhesion molecule-A redistribution. In: *Atherosclerosis* 234 (2), S. 254–264. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.03.014.

Schön, M. P.; Boehncke, W.-H. (2005): Psoriasis. In: *N Engl J Med* 352 (18), S. 1899–1912. DOI: 10.1056/nejmra041320.

Schulz, M.; Laufs, U.; Mörike, K.; Schott, G.; Tschöpe, D.; Hardt, R. (2019): Nationale Versorgungsleitlinie: Chronische Herzinsuffizienz. Hg. v. AWMF, BÄK, KBV. Online verfügbar unter <https://www.leitlinien.de/themen/herzinsuffizienz/3-auflage>, zuletzt aktualisiert am 2020.

Schwager, J.; Richard, N.; Widmer, F.; Raederstorff, D. (2017): Resveratrol distinctively modulates the inflammatory profiles of immune and endothelial cells. In: *BMC Complement Altern Med* 17 (1), S. 309. DOI: 10.1186/s12906-017-1823-z.

Scuteri, A.; Laurent, S.; Cucca, F.; Cockcroft, J.; Cunha, P. G.; Mañas, L. R. et al. (2015): Metabolic syndrome across Europe: different clusters of risk factors. In: *Eur J Prev Cardiol* 22 (4), S. 486–491. DOI: 10.1177/2047487314525529.

Sen, R.; Baltimore, D. (1986): Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. In: *Cell* 46 (5), S. 705–716. DOI: 10.1016/0092-8674(86)90346-6.

- Serasanambati, M.; Chilakapati, S. R. (2016): Function of Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) in Human Diseases-A Review. In: *sijbs* 2 (4), S. 368. DOI: 10.22205/sijbs/2016/v2/i4/103443.
- Shapiro, J.; Cohen, A. D.; David, M.; Hodak, E.; Chodik, G.; Viner, A. et al. (2007): The association between psoriasis, diabetes mellitus, and atherosclerosis in Israel: a case-control study. In: *J Am Acad Dermatol* 56 (4), S. 629–634. DOI: 10.1016/j.jaad.2006.09.017.
- Shaw, S. K.; Perkins, B. N.; Lim, Y.-C.; Liu, Y.; Nusrat, A.; Schnell, F. J. et al. (2001): Reduced Expression of Junctional Adhesion Molecule and Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (CD31) at Human Vascular Endothelial Junctions by Cytokines Tumor Necrosis Factor- α Plus Interferon- γ Does Not Reduce Leukocyte Transmigration Under Flow. In: *Am J Pathol* 159 (6), S. 2281–2291. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63078-7.
- Singh, S.; Anshita, D.; Ravichandiran, V. (2021): MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease. In: *Int Immunopharmacol* 101, S. 107598. DOI: 10.1016/j.intimp.2021.107598.
- Smith, C. W. (2008): 3. Adhesion molecules and receptors. In: *J Allergy Clin Immunol* 121 (2 Suppl), S375-9; quiz S414. DOI: 10.1016/j.jaci.2007.07.030.
- Smith, E.; Prasad, K.-M. R.; Butcher, M.; Dobrian, A.; Kolls, J. K.; Ley, K.; Galkina, E. (2010): Blockade of interleukin-17A results in reduced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. In: *Circulation* 121 (15), S. 1746–1755. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.924886.
- Smith, J. D.; Trogan, E.; Ginsberg, M.; Grigaux, C.; Tian, J.; Miyata, M. (1995): Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (18), S. 8264–8268. DOI: 10.1073/pnas.92.18.8264.
- Stebut, E. von; Reich, K.; Thaçi, D.; Koenig, W.; Pinter, A.; Körber, A. et al. (2019): Impact of Secukinumab on Endothelial Dysfunction and Other Cardiovascular Disease Parameters in Psoriasis Patients over 52 Weeks. In: *J Invest Dermatol* 139 (5), S. 1054–1062. DOI: 10.1016/j.jid.2018.10.042.

Steinitz, M. (2000): Quantitation of the blocking effect of tween 20 and bovine serum albumin in ELISA microwells. In: *Anal Biochem* 282 (2), S. 232–238. DOI: 10.1006/abio.2000.4602.

Subramanian, M.; Thorp, E.; Tabas, I. (2015): Identification of a non-growth factor role for GM-CSF in advanced atherosclerosis: promotion of macrophage apoptosis and plaque necrosis through IL-23 signaling. In: *Circ Res* 116 (2), e13-24. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.304794.

Sun, Y.; Liu, W.-Z.; Liu, T.; Feng, X.; Yang, N.; Zhou, H.-F. (2015): Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. In: *J Recept Signal Transduct Res* 35 (6), S. 600–604. DOI: 10.3109/10799893.2015.1030412.

Takahashi, H.; Tsuji, H.; Hashimoto, Y.; Ishida-Yamamoto, A.; Iizuka, H. (2010): Serum cytokines and growth factor levels in Japanese patients with psoriasis. In: *Clin Exp Dermatol* 35 (6), S. 645–649. DOI: 10.1111/j.1365-2230.2009.03704.x.

Tan, P.; Fuchs, S. Y.; Chen, A.; Wu, K.; Gomez, C.; Ronai, Z.; Pan, Z.-Q. (1999): Recruitment of a ROC1–CUL1 Ubiquitin Ligase by Skp1 and HOS to Catalyze the Ubiquitination of I κ B α . In: *Molecular Cell* 3 (4), S. 527–533. DOI: 10.1016/s1097-2765(00)80481-5.

Tang, Y.; Feng, Y.; Wang, X. (1998): Calcitonin gene-related peptide potentiates LPS-induced IL-6 release from mouse peritoneal macrophages. In: *J Neuroimmunol* 84 (2), S. 207–212. DOI: 10.1016/S0165-5728(97)00257-9.

Tavares, L. P.; Negreiros-Lima, G. L.; Lima, K. M.; E Silva, P. M. R.; Pinho, V.; Teixeira, M. M.; Sousa, L. P. (2020): Blame the signaling: Role of cAMP for the resolution of inflammation. In: *Pharmacol Res* 159, S. 105030. DOI: 10.1016/j.phrs.2020.105030.

Tedgui, A.; Mallat, Z. (2006): Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. In: *Physiol Rev* 86 (2), S. 515–581. DOI: 10.1152/physrev.00024.2005.

Townsend, N.; Wilson, L.; Bhatnagar, P.; Wickramasinghe, K.; Rayner, M.; Nichols, M. (2016): Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. In: *Eur Heart J* 37 (42), S. 3232–3245. DOI: 10.1093/eurheartj/ehw334.

Tsuchiya, S.; Yamabe, M.; Yamaguchi, Y.; Kobayashi, Y.; Konno, T.; Tada, K. (1980): Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). In: *Int J Cancer* 26 (2), S. 171–176. DOI: 10.1002/ijc.2910260208.

Usui, F.; Kimura, H.; Ohshiro, T.; Tatsumi, K.; Kawashima, A.; Nishiyama, A. et al. (2012): Interleukin-17 deficiency reduced vascular inflammation and development of atherosclerosis in Western diet-induced apoE-deficient mice. In: *Biochem Biophys Res Commun* 420 (1), S. 72–77. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.02.117.

van Noorden, R.; Maher, B.; Nuzzo, R. (2014): The top 100 papers. In: *Nature* 514 (7524), S. 550–553. DOI: 10.1038/514550a.

Virchow, R. (1856): *Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medicin*. <https://archive.org/details/b21462161> External identifier: urn:oclc:record:1040241515. In: Meidinger Sohn & Comp.

Virmani, R.; Kolodgie, F. D.; Burke, A. P.; Farb, A.; Schwartz, S. M. (2000): Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20 (5), S. 1262–1275. DOI: 10.1161/01.atv.20.5.1262.

Vogel, R. A. (2009): Coronary risk factors, endothelial function, and atherosclerosis: A review. In: *Clin Cardiol* 20 (5), S. 426–432. DOI: 10.1002/clc.4960200505.

Volpes, R.; van den Oord, J. J.; Desmet, V. J. (1992): Vascular adhesion molecules in acute and chronic liver inflammation. In: *Hepatology* 15 (2), S. 269–275. DOI: 10.1002/hep.1840150216.

Waldo, S. W.; Li, Y.; Buono, C.; Zhao, B.; Billings, E. M.; Chang, J.; Kruth, H. S. (2008): Heterogeneity of human macrophages in culture and in atherosclerotic plaques. In: *Am J Pathol* 172 (4), S. 1112–1126. DOI: 10.2353/ajpath.2008.070513.

Wang, B.; Sun, W.; Bi, K.; Li, Y.; Li, F. (2021): Apremilast prevents IL-17-induced cellular senescence in ATDC5 chondrocytes mediated by SIRT1. In: *Int J Mol Med* 47 (3). DOI: 10.3892/ijmm.2021.4845.

Wang, H.; Yang, G.; Zhang, Q.; Liang, X.; Liu, Y.; Gao, M. et al. (2020): Apremilast ameliorates ox-LDL-induced endothelial dysfunction mediated by KLF6. In: *Aging (Albany NY)* 12 (19), S. 19012–19021. DOI: 10.18632/aging.103665.

Wang, H.-J.; Zhou, Y.; Liu, R.-M.; Qin, Y.-S.; Cen, Y.-H.; Hu, L.-Y. et al. (2017): IP-10/CXCR3 Axis Promotes the Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells through ERK1/2/CREB Signaling Pathway. In: *Cell Biochem Biophys* 75 (1), S. 139–147. DOI: 10.1007/s12013-017-0782-9.

Wang, J.; Wang, S.; Lu, Y.; Weng, Y.; Gown, A. M. (1994): GM-CSF and M-CSF expression is associated with macrophage proliferation in progressing and regressing rabbit atheromatous lesions. In: *Exp Mol Pathol* 61 (2), S. 109–118. DOI: 10.1006/exmp.1994.1030.

Wang, W.; Deng, M.; Liu, X.; Ai, W.; Tang, Q.; Hu, J. (2011): TLR4 activation induces nontolerant inflammatory response in endothelial cells. In: *Inflammation* 34 (6), S. 509–518. DOI: 10.1007/s10753-010-9258-4.

Wang, X.; Yue, T. L.; Ohlstein, E. H.; Sung, C. P.; Feuerstein, G. Z. (1996): Interferon-inducible protein-10 involves vascular smooth muscle cell migration, proliferation, and inflammatory response. In: *J Biol Chem* 271 (39), S. 24286–24293. DOI: 10.1074/jbc.271.39.24286.

Wang, Y.; Cao, J.; Fan, Y.; Xie, Y.; Xu, Z.; Yin, Z. et al. (2016): Artemisinin inhibits monocyte adhesion to HUVECs through the NF- κ B and MAPK pathways in vitro. In: *Int J Mol Med* 37 (6), S. 1567–1575. DOI: 10.3892/ijmm.2016.2579.

Westra, J.; Kułdo, J. M.; van Rijswijk, M. H.; Molema, G.; Limburg, P. C. (2005): Chemokine production and E-selectin expression in activated endothelial cells are inhibited by p38 MAPK (mitogen activated protein kinase) inhibitor RWJ 67657. In: *Int Immunopharmacol* 5 (7-8), S. 1259–1269. DOI: 10.1016/j.intimp.2005.03.005.

WHO (2018): Top 10 causes of death. Online verfügbar unter <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.

WHO (2020): The top 10 causes of death. WHO. Online verfügbar unter <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.

Woodfin, A.; Reichel, C. A.; Khandoga, A.; Corada, M.; Voisin, M.-B.; Scheiermann, C. et al. (2007): JAM-A mediates neutrophil transmigration in a stimulus-specific manner in vivo: evidence for sequential roles for JAM-A and PECAM-1 in neutrophil transmigration. In: *Blood* 110 (6), S. 1848–1856. DOI: 10.1182/blood-2006-09-047431.

- Wu, J. J.; Poon, K.-Y. T.; Channual, J. C.; Shen, A. Y.-J. (2012): Association between tumor necrosis factor inhibitor therapy and myocardial infarction risk in patients with psoriasis. In: *Arch Dermatol* 148 (11), S. 1244–1250. DOI: 10.1001/archdermatol.2012.2502.
- Wu, K. K.; Thiagarajan, P. (1996): Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. In: *Annu Rev Med* 47, S. 315–331. DOI: 10.1146/annurev.med.47.1.315.
- Xiao, J.; Yao, R.; Xu, B.; Wen, H.; Zhong, J.; Li, D. et al. (2020): Inhibition of PDE4 Attenuates TNF- α -Triggered Cell Death Through Suppressing NF- κ B and JNK Activation in HT-22 Neuronal Cells. In: *Cell Mol Neurobiol* 40 (3), S. 421–435. DOI: 10.1007/s10571-019-00745-w.
- Yadav, A.; Saini, V.; Arora, S. (2010): MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. In: *Clin Chim Acta* 411 (21-22), S. 1570–1579. DOI: 10.1016/j.cca.2010.07.006.
- Yeh, M.; Leitinger, N.; Martin, R. de; Onai, N.; Matsushima, K.; Vora, D. K. et al. (2001): Increased transcription of IL-8 in endothelial cells is differentially regulated by TNF-alpha and oxidized phospholipids. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21 (10), S. 1585–1591. DOI: 10.1161/hq1001.097027.
- Yusuf-Makagiansar, H.; Anderson, M. E.; Yakovleva, T. V.; Murray, J. S.; Siahaan, T. J. (2002): Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases. In: *Med Res Rev* 22 (2), S. 146–167. DOI: 10.1002/med.10001.
- Zaccolo, M.; Zerio, A.; Lobo, M. J. (2021): Subcellular Organization of the cAMP Signaling Pathway. In: *Pharmacol Rev* 73 (1), S. 278–309. DOI: 10.1124/pharmrev.120.000086.
- Zappasodi, R.; Budhu, S.; Abu-Akeel, M.; Merghoub, T. (2019): In vitro assays for effector T cell functions and activity of immunomodulatory antibodies. In: *Methods Enzymol* 631, S. 43–59. DOI: 10.1016/bs.mie.2019.08.012.
- Zhang, J. (2022): Biomarkers of endothelial activation and dysfunction in cardiovascular diseases. In: *Rev Cardiovasc Med* 23 (2), S. 73. DOI: 10.31083/j.rcm2302073.

- Zhang, L.; Liu, M.; Liu, W.; Hu, C.; Li, H.; Deng, J. et al. (2021): Th17/IL-17 induces endothelial cell senescence via activation of NF- κ B/p53/Rb signaling pathway. In: *Lab Invest* 101 (11), S. 1418–1426. DOI: 10.1038/s41374-021-00629-y.
- Zheng, T.; Zhou, Q.; Chen, Z.; Wang, Q. (2019): Correlation between expression levels of IL-37, GM-CSF, and CRP in peripheral blood and atherosclerosis and plaque stability. In: *Eur J Inflamm* 17, 205873921984406. DOI: 10.1177/2058739219844068.
- Zhong, L.; Simard, M. J.; Huot, J. (2018): Endothelial microRNAs regulating the NF- κ B pathway and cell adhesion molecules during inflammation. In: *FASEB J* 32 (8), S. 4070–4084. DOI: 10.1096/fj.201701536r.
- Zhong, X.; Li, X.; Liu, F.; Tan, H.; Shang, D. (2012): Omentin inhibits TNF- α -induced expression of adhesion molecules in endothelial cells via ERK/NF- κ B pathway. In: *Biochem Biophys Res Commun* 425 (2), S. 401–406. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.07.110.
- Zhou, Z.; Connell, M. C.; MacEwan, D. J. (2007): TNFR1 -induced NF-kappaB, but not ERK, p38MAPK or JNK activation, mediates TNF-induced ICAM-1 and VCAM-1 expression on endothelial cells. In: *Cell Signal* 19 (6), S. 1238–1248. DOI: 10.1016/j.cellsig.2006.12.013.
- Zhu, S.-N.; Chen, M.; Jongstra-Bilen, J.; Cybulsky, M. I. (2009): GM-CSF regulates intimal cell proliferation in nascent atherosclerotic lesions. In: *J Exp Med* 206 (10), S. 2141–2149. DOI: 10.1084/jem.20090866.

11 Publikationsverzeichnis

Otto Mark, Dorn Britta, Grasmik Tatjana, Doll Monika, Meissner Markus, Jakob Thilo, Hrgovic Igor. (2022): Apremilast effectively inhibits TNF α -induced vascular inflammation in human endothelial cells. In: *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 36(2), S. 237-246. DOI: 10.1111/jdv.17769.

12 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort/Datum

Unterschrift

Die Danksagung wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.