

Aus der

Klinik für Innere Medizin III - Gastroenterologie,

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Klinikdirektor: Prof. Dr. med. F. Lammert

**„Die Rolle von Integrin β 3 bei Diabetes Mellitus und
seinen Folgeerkrankungen“**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2021

Vorgelegt von: Helmer Philipp

geb. am 13.05.1993 in Merzig

Tag der Promotion: 19.11.2021

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. Jochen Schneider
Prof. Dr. Ulrich Boehm

Die vorgelegte Arbeit befindet sich aktuell im Review-Prozess zur Veröffentlichung:

Helmer P, Damm E, Schneider JG, Association of the Leu33Pro gain of function variant in β 3-integrin with kidney function but not with inflammatory activity in human derived macrophages in diabetes (International Journal of Medical Sciences)

Sonstige Publikationen des Autors:

Amrein K, Parekh D, Meybohm P, VITDALIZE Collaboration Group (**Helmer P.**, ...) (2019) Effect of high-dose vitamin D3 on 28-day mortality in adult critically ill patients with severe vitamin D deficiency: a study protocol of a multicentre, placebo-controlled double-blind phase III RCT (the VITDALIZE study). *BMJ Open*. 12;9(11):e031083

Schmitt E, Meybohm P, ... **Helmer P**, Neb H (2019) In-line filtration of intravenous infusion may reduce organ dysfunction of adult critical patients. *Crit Care*. 22;23(1):373

Hottenrott S, Schlesinger T, **Helmer P**, Kranke P (2020) Do Small Incisions Need Only Minimal Anesthesia?-Anesthetic Management in Laparoscopic and Robotic Surgery. *J Clin Med*. 15;9(12):4058

Herrmann J, Adam EH, **Helmer P**, ..., Lotz C (2020) COVID-19 Induced Acute Respiratory Distress Syndrome-A Multicenter Observational Study. *Front Med (Lausanne)*. 18;7:599533

Meybohm P, ..., Zacharowski K, LIBERAL Collaboration Group (...**Helmer P.**) (2019) Liberal transfusion strategy to prevent mortality and anaemia-associated, ischaemic events in elderly non-cardiac surgical patients - the study design of the LIBERAL-Trial. *Trials*. 4;20(1):101

Schwarzkopf D, ..., Reinhart K, OPTIMISE study group (...**Helmer P.**) (2020) Validation study of German inpatient administrative health data for epidemiological surveillance and measurement of quality of care for sepsis: the OPTIMISE study protocol. *BMJ Open*. 5;10(10):e035763

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Integrin β 3	1
1.2	RS 5918 Polymorphismus	2
1.3	Diabetes Mellitus.....	3
1.3.1	Klassifikation	3
1.3.2	Diagnostik	4
1.4	Arteriosklerose und weitere mit Diabetes Mellitus assoziierte Erkrankungen	6
1.5	Arteriosklerose und das Immunsystem - Monozyten und Makrophagen.....	8
1.5.1	Zytokine – Botenstoffe des Immunsystems	10
1.5.2	MPO	11
1.6	Zielsetzung der Arbeit	12
2.	Methodenteil	13
2.1	Rechtliches und Allgemeines	13
2.2	Patientenrekrutierung und Datenerhebung	13
2.3	DNA-Isolation	14
2.4	Quantifizierung der vorhandenen DNA in den Blut-Proben	14
2.5	Real-time PCR und Genotypisierung	15
2.6	Monozytenisolation und Quantifizierung.....	18
2.7	Kultivierung der Monozyten und Ausdifferenzierung zu Makrophagen	19
2.8	Charakterisierung der kultivierten Makrophagen durch Immunofluoreszenz	20
2.9	Überprüfung der Vitalität der kultivierten Makrophagen durch Dil markiertes oxLDL-Aufnahme	21
2.10	Zellstimulation.....	22
2.11	Überstand- und Zellernte	22
2.12	MPO-ELISA	23
2.13	Multiplex-Elisa	24
2.14	Indirekte Quantifizierung der kultivierten Makrophagen durch..... die Proteinbestimmung nach Lowry	26
2.15	Statistische Auswertung und verwendete Programme	26
2.16	Labor- und Vitalparameter	28
2.17	Zytokine	29
2.18	Chemikalien.....	30
2.19	Geräte	31
2.20	Kits & ELISAs.....	31

3.	Ergebnisteil	32
3.1	Statistische Auswertung der anthropometrischen Daten und der Laborparameter	32
3.2	Monozytenkultivierung.....	41
3.3	Immunzytochemie	43
3.4	Zellstimulation.....	44
3.5	Genotypabhängige Zytokin- und MPO-Sekretionen	47
4.	Diskussion.....	53
4.1	Prävalenz des RS 5918 Polymorphismus	53
4.2	Rolle von Integrin β 3 bei Diabetes Mellitus und seinen Folgeerkrankungen	53
4.3	Quantitative Aktivitätsmessung der stimulierten Makrophagen anhand der..... Zytokinsekretion und zellbiologischer Einfluss des RS 5918 Polymorphismus.. auf stimulierte Makrophagen	57
4.4	Limitationen der Zellkultur und Ergebnisinterpretation.....	58
4.5	Aussichten und Zusammenfassung.....	60
5.	Abkürzungsverzeichnis.....	61
6.	Literatur	63
7.	Abbildungsverzeichnis.....	71
8.	Tabellenverzeichnis	73
9.	Danksagung	I
10.	Lebenslauf.....	II
11.	Appendix I	IV
12.	Appendix II	XII

Zusammenfassung

Diese Arbeit befasst sich mit den Auswirkungen des Leu33Pro Polymorphismus (RS 5918) des Integrin β 3 Gens auf die inflammatorische Aktivität von humanen Makrophagen im Zusammenhang mit dem Auftreten von Folgeerkrankungen bei Diabetes Mellitus. Integrin β 3 ist ein heterodimeres Membranprotein. Neben mechanischen Funktionen der Zelladhäsion werden Funktionen in der Signalübermittlung zwischen den Zellen vermittelt. Es hat Einfluss auf die Proteinbiosynthese, Genexpression und auch auf die Differenzierung von Zellen. Der untersuchte Polymorphismus resultiert in einer konstitutionellen Aktivierung des Integrin β 3. In diversen Studien kann gezeigt werden, dass Diabetiker eine erhöhte Prävalenz des untersuchten Polymorphismus im Vergleich zur Normalbevölkerung haben. Zudem haben Diabetiker ebenfalls ein erhöhtes Risiko für arteriosklerotische Veränderungen, die eine Folgeerkrankung des Diabetes darstellen. Deshalb wird in dieser Studie ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus und den diabetischen Folgeerkrankungen untersucht.

Es wurden 186 an Diabetes Mellitus erkrankte Patienten auf diesen Polymorphismus untersucht. Von diesen Patienten wurden verschiedene Laborparameter sowie anthropometrische Daten gesammelt, um einen Zusammenhang zwischen klinisch-laborchemischen Parametern und der Präsenz dieses Polymorphismus zu untersuchen. Des Weiteren wurden periphere Blutmonozyten von insgesamt 21 Patienten isoliert und *in vitro* zu Makrophagen differenziert. Ziel dieser Experimente war die Untersuchung der inflammatorischen Aktivität der Makrophagen in Abhängigkeit des RS 5918 Polymorphismus im Integrin β 3 Gen, da Inflammation eine wichtige pathophysiologische Rolle bei diabetischen Folgeerkrankungen spielt.

Der Polymorphismus hatte in der untersuchten Kohorte eine homozygote Häufigkeit von 3,23 % und eine heterozygote Häufigkeit von 26,34 %. Daraus resultierte, dass fast 30 % der Untersuchten mindestens haploinsuffizient für den RS 5918 Polymorphismus im Integrin β 3 Gen waren. Aus den laborchemischen und anthropometrischen Daten war ein trendhafter Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein des Polymorphismus und der Erkrankungshäufigkeit der diabetischen Nephropathie erkennbar. Zudem korreliert der untersuchte Polymorphismus mit statistisch signifikant niedrigeren γ -GT Werten. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang des Polymorphismus mit den weiteren untersuchten

Folgeerkrankungen konnte nicht gezeigt werden. Zusätzlich konnte kein molekularbiologisch bedeutsamer Einfluss des untersuchten Polymorphismus auf die hier gemessenen Parameter der inflammatorischen Aktivität von Makrophagen gezeigt werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es zum Teil trendhafte Effekte des untersuchten Polymorphismus auf die inflammatorische Aktivität humaner Makrophagen gibt. Ferner gibt es einen möglichen Zusammenhang mit Folgeerkrankungen des Diabetes Mellitus. Dies bedarf aber weiterer wissenschaftlicher Prüfungen.

Summary

The role of integrin β 3 in diabetes mellitus and its secondary diseases

This thesis deals with the effects of the Leu33Pro polymorphism (RS 5918) of the integrin β 3 gene on the inflammatory activity of human macrophages in connection with the occurrence of secondary diseases in diabetes mellitus. Integrin β 3 is a heterodimeric membrane protein that, in addition to mechanical functions of cell adhesion, also mediates important functions in signal transduction between cells. It has an influence on protein biosynthesis, gene expression and also on the differentiation of cells. The investigated polymorphism results in a constitutional activation of integrin β 3. In various studies it can be shown that diabetics have an increased prevalence of the investigated polymorphism compared to the normal population. In addition, diabetics also have an increased risk of arteriosclerotic changes, which are a secondary disease of diabetes. Therefore, this study investigates a possible correlation between the polymorphism and diabetic secondary diseases.

186 patients suffering from diabetes mellitus were examined for this polymorphism. From these patients, various laboratory parameters, as well as anthropometric data were collected to investigate a relationship between clinical laboratory chemical parameters and the presence of this polymorphism. Furthermore, peripheral blood monocytes from a total of 21 patients were isolated and differentiated *in vitro* to macrophages. The aim of these experiments was to investigate the inflammatory activity of macrophages, since inflammation plays an important pathophysiological role in diabetic secondary diseases.

The polymorphism had a homozygous frequency of 3.23% and a heterozygous frequency of 26.34% in the examined cohort. As a result, almost 30% of the examined cohort were at least haploinsufficient for the integrin β 3 gene. From the laboratory chemical and anthropometric data, a trendy correlation between the presence of the polymorphism and the incidence of diabetic nephropathy can be seen. In addition, the polymorphism investigated results in statistically significant lower γ -GT values. A statistical correlation of the polymorphism with the other secondary diseases investigated cannot be shown.

In addition, no molecular-biologically significant influence of the polymorphism under investigation on the parameters of inflammatory activity of macrophages measured here could be shown.

In summary, it can be stated that there are partially trend-like effects of the investigated polymorphism on the inflammatory activity of human macrophages. Furthermore, there is a possible connection with secondary diseases of diabetes mellitus. This requires further scientific research.

1. Einleitung

1.1 Integrin β 3

Integrine sind Zelladhäsionsmoleküle, die sowohl Zellen untereinander als auch mit ihrer Extrazellulärmatrix verbinden. Dabei erfüllen sie nicht nur eine rein mechanische Funktion, sondern sind auch an der Signalübermittlung durch Induktion von verschiedenen Signalwegen zwischen den Zellen und ihrer Matrix beteiligt. Somit können sie Einfluss auf die Genexpression, die Proteinbiosynthese und die Zelldifferenzierung nehmen [1–3]. Integrine sind Heterodimere, bestehen also aus zwei verschiedenen, miteinander verbundenen Glykoproteinketten (Abbildung 1). Literaturabhängig wird von 18 α -Untereinheiten und 8 β -Untereinheiten gesprochen. Daraus resultieren insgesamt 24 verschiedene Integrine, die sich sowohl im Aufbau als auch teilweise in ihrer Funktion unterscheiden [3].

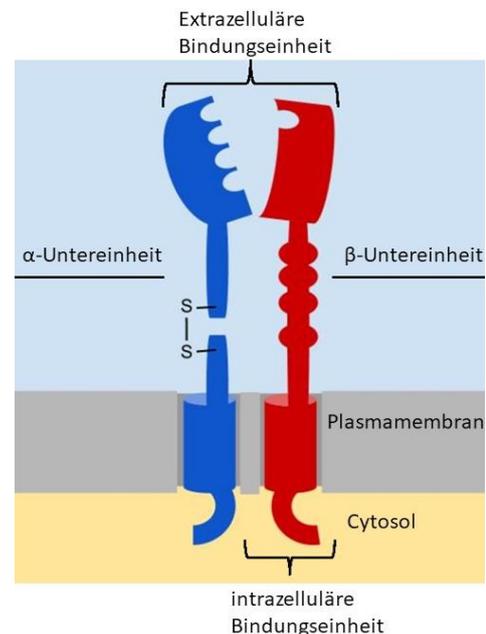


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Integrins. α -Untereinheit in blau und β -Untereinheit in rot. Modifizierte Abbildung aus: Frick A, Grammel D, Schüller U, (2012). Proper cerebellar development requires expression of $\beta 1$ -integrin in Bergmann glia, but not in granule neurons. *Glia*, 60 5, 820-32 .

Das in dieser Arbeit behandelte Integrin β 3 gehört zu den β -Untereinheiten und ist dabei wichtiger Bestandteil vom Glykoprotein GPIIb/IIIa (α I**b** β 3) und des Vitronectinrezeptors (α v **β** 3). Das GPIIb/IIIa spielt eine wichtige Rolle bei der Thrombozytenaggregation und Gerinnungskaskade [4]. So ist beispielsweise die Glanzmann Thrombasthenie durch Mutationen in einer Untereinheit des GPIIb/IIIa Rezeptors bedingt, die in dessen Fehlfunktion resultiert. Diese Erkrankung zeichnet sich durch eine Gerinnungsstörung aus, die durch eine Thrombozytenaggregationsstörung bedingt ist. Überraschenderweise bietet diese Erkrankung aber keinen Schutz vor Arteriosklerose, obwohl bei der Pathophysiologie der Arteriosklerose die Aggregation von Thrombozyten maßgeblich beteiligt ist [5]. Der Vitronectinrezeptor erfüllt vielfältige Funktionen, und er wird in vielen verschiedenen Geweben exprimiert, wie z. B. glatten Muskelzellen, Immunzellen, Osteoklasten und teilweise auch in Tumorzellen. Er spielt eine Rolle beim Knochenumbau, bei vielen proliferativen Prozessen und der Angiogenese [6–9].

Daneben gibt es weitere Erkrankungen, bei denen es zu einer Veränderung der genannten Rezeptoren kommt. An Diabetes Mellitus erkrankte Personen zeigen signifikant höhere Blutlevel an GPIIb/IIIa auf Thrombozyten als Nichtdiabetiker und eine erhöhte Anzahl von im Blut zirkulierenden aktivierten

Thrombozyten [10]. Zudem wird Integrin β 3 in Makrophagen bei Patienten mit Morbus Crohn während der Inflammation stärker exprimiert [11], wobei es unklar bleibt, ob Integrin β 3 in diesem Zusammenhang die Entzündung als pro-inflammatorischer Mediator verstärkt oder eine anti-inflammatorische Wirkung zeigt, um eine überschießende Immunreaktion zu verhindern.

Es kann an Mausmodellen gezeigt werden, dass Integrin β 3 defiziente Makrophagen an den inflammatorischen Prozessen und der Entstehung der Arteriosklerose beteiligt sind. Basierend auf diesen Ergebnissen wird eine indirekte anti-inflammatorische Rolle von Integrin β 3 in Makrophagen suggeriert [12]. Basierend auf den beschriebenen Effekten könnte daher eine Veränderung des Risikos für arteriosklerotische Veränderungen bei Diabetikern angenommen werden. Es ist nicht eindeutig geklärt, welche Funktionen im Einzelnen dem Integrin β 3 bei den inflammatorischen Prozessen in der Pathophysiologie der Arteriosklerose zugeschrieben werden können.

1.2 RS 5918 Polymorphismus

Ein Polymorphismus beschreibt die Existenz verschiedener genetischer Variationen von singulären Basenpaaren in einem komplementären DNA-Doppelstrang, die im Gegensatz zu Mutationen vererbbar sind. Der in dieser Arbeit untersuchte RS 5918 Polymorphismus bezieht sich auf eine Veränderung im Gen von Integrin β 3 auf Chromosom 17 an Position 1565. Dort wird die Aminosäure Thymin durch Cytosin ersetzt. Daraus resultiert ein konstitutionell aktives Integrin β 3, bei dem vermutet wird, dass sich dessen inflammatorische Aktivität im Vergleich zum Wildtyp unterscheidet [13]. Ein möglicher Erklärungsansatz dafür könnte in einer erhöhten physikalischen Flexibilität des veränderten Integrin β 3 liegen [14]. Zu diesem Ergebnis kommt eine Studie, die Veränderungen der Aktivität des Integrin β 3 in den Gehirnen von Mäusen untersucht [15]. Eine Arbeitsgruppe aus Nashville, Tennessee, hat im Mausmodell die Veränderung der Signaltransduktion durch den RS 5918 Polymorphismus untersucht. Es kann gezeigt werden, dass es bedingt durch den Polymorphismus zu einer vermehrten Phosphorylierung der Tyrosinkinase Src kommt. Infolgedessen wird eine Hyperkoagulabilität der Thrombozyten hervorgerufen [16].

Basierend darauf wird in der Literatur kontrovers diskutiert, inwiefern die Aktivitätsänderung des Integrin β 3 durch den Polymorphismus im Zusammenhang mit der Inzidenz von kardiovaskulären Erkrankungen bei Diabetikern steht. Da literaturabhängig sowohl die Prävalenz des untersuchten Polymorphismus als auch die Inzidenz von arteriosklerotischen Veränderungen bei Diabetikern im Vergleich zur Normalbevölkerung erhöht sind, wird ein Zusammenhang vermutet. Im experimentellen Mausmodell zeigt sich, dass Integrin β 3 defiziente Mäuse ein höheres Risiko auf Arteriosklerose haben [12]. Daher kann spekuliert werden, dass sowohl eine Unter- als auch eine Überaktivität des

Integrin $\beta 3$ das Risiko auf arteriosklerotisch bedingte Erkrankungen erhöhen könnte. Ferner zeigen einige Studien eine signifikante Assoziation der Inzidenz des Diabetes Mellitus mit einer Veränderung des Integrin $\beta 3$ Gens [17]. Eine Studie zeigt einen Zusammenhang des Polymorphismus bei Diabetikern mit erhöhten HbA1c-Werten verglichen mit Wildtypträgern [18]. In anderen Studien kann dieser Zusammenhang jedoch nicht bestätigt werden [19, 20].

1.3 Diabetes Mellitus

„Als Diabetes mellitus bezeichnet man eine Gruppe von Stoffwechselerkrankungen, die alle durch Hyperglykämie in Folge von Störungen der Insulinsekretion und/oder der Insulinwirkung gekennzeichnet sind. Die chronische Hyperglykämie bei Diabetes ist assoziiert mit Langzeitschäden, Funktionsstörungen und Funktionseinschränkungen verschiedener Organe – insbesondere der Augen, Nieren, Nerven und des Herz-Kreislauf-Systems“ [21].

Diabetes Mellitus kann in vier Subtypen unterteilt werden. Im Folgenden werden die beiden häufigsten Typen näher erläutert. Typ 3 und 4 sind sehr selten und zum Teil nur in spezifischen Patientenkollektiven vorzufinden, sodass diese Typen im Folgenden nicht berücksichtigt werden.

1.3.1 Klassifikation

Der Typ 1 Diabetes ist im Gegensatz zum Typ 2 Diabetes meist durch einen absoluten Insulinmangel gekennzeichnet. Er wird weiter in einen immunologisch bedingten Typ A und in einen idiopathischen Typ B gegliedert [22]. Beim immunologischen Typ A bilden sich u. a. Autoantikörper gegen β -Zellen des Pankreas, und es kommt durch eine Zerstörung dieser Zellen zu einer Verminderung der Insulinsekretion, wenn mehr als 80 % der B-Zellen zerstört sind. Dieser Typ ist im jungen Lebensalter sehr typisch, kann aber auch in höherem Alter auftreten. Diese Sonderform wird als latent autoimmune diabetes in adults (LADA) bezeichnet. Beim idiopathischen Typ B liegt eine Insuffizienz der endogenen Insulinproduktion vor, ohne dass Autoantikörper nachweisbar sind. Diese Form ist besonders in Afrika und Asien verbreitet. Auch zeigt Typ 1 Diabetes eine erbliche Komponente mit enger Assoziation zu HLA-DR3 und HLA-DR4 [23] und weiteren HLA Genen [24].

„Der Typ 2 Diabetes ist eine chronisch progrediente Erkrankung, die durch vererbte und erworbene Insulinresistenz und durch Insulinsekretionsstörung charakterisiert ist“ [21]. Dabei liegt meist kein absoluter, sondern ein relativer Insulinmangel vor. Es gibt mehrere Faktoren, die das Auftreten eines Typ 2 Diabetes begünstigen. Neben genetischen Faktoren [25], Medikamenten, Lebensalter [26] und Lebensstil [22] gibt es auch Syndrome, die mit einem Diabetes Mellitus einhergehen. Dazu zählt das

metabolische Syndrom [27] und das polyzystische Ovarialsyndrom. Typ 2 Diabetes ist mit einer Häufigkeit von 95 % die häufigste Form [22].

1.3.2 Diagnostik

Es gibt mehrere Möglichkeiten einen Diabetes Mellitus zu diagnostizieren. Häufig fällt ein Diabetes Mellitus als Zufallsbefund durch einen erhöhten Nüchtern-Plasma-Glukose-Spiegel von ≥ 126 mg/dl in einer hausärztlichen Routinediagnostik auf. Durchschnittlich vergehen fünf bis acht Jahre zwischen dem Auftreten der Erkrankung bis zur endgültigen Diagnose [22]. Das führt dazu, dass bereits die Hälfte der neudiagnostizierten Diabetiker makrovaskuläre Komplikationen zeigen [22]. Als weiterer Test neben der mehrfachen Bestimmung der Nüchtern-Plasma-Glukose zu unterschiedlichen Zeitpunkten kann ein oraler Glucosetoleranztest (oGTT) durchgeführt werden. Abbildung 2 zeigt eine schematische Darstellung der Diagnostik.

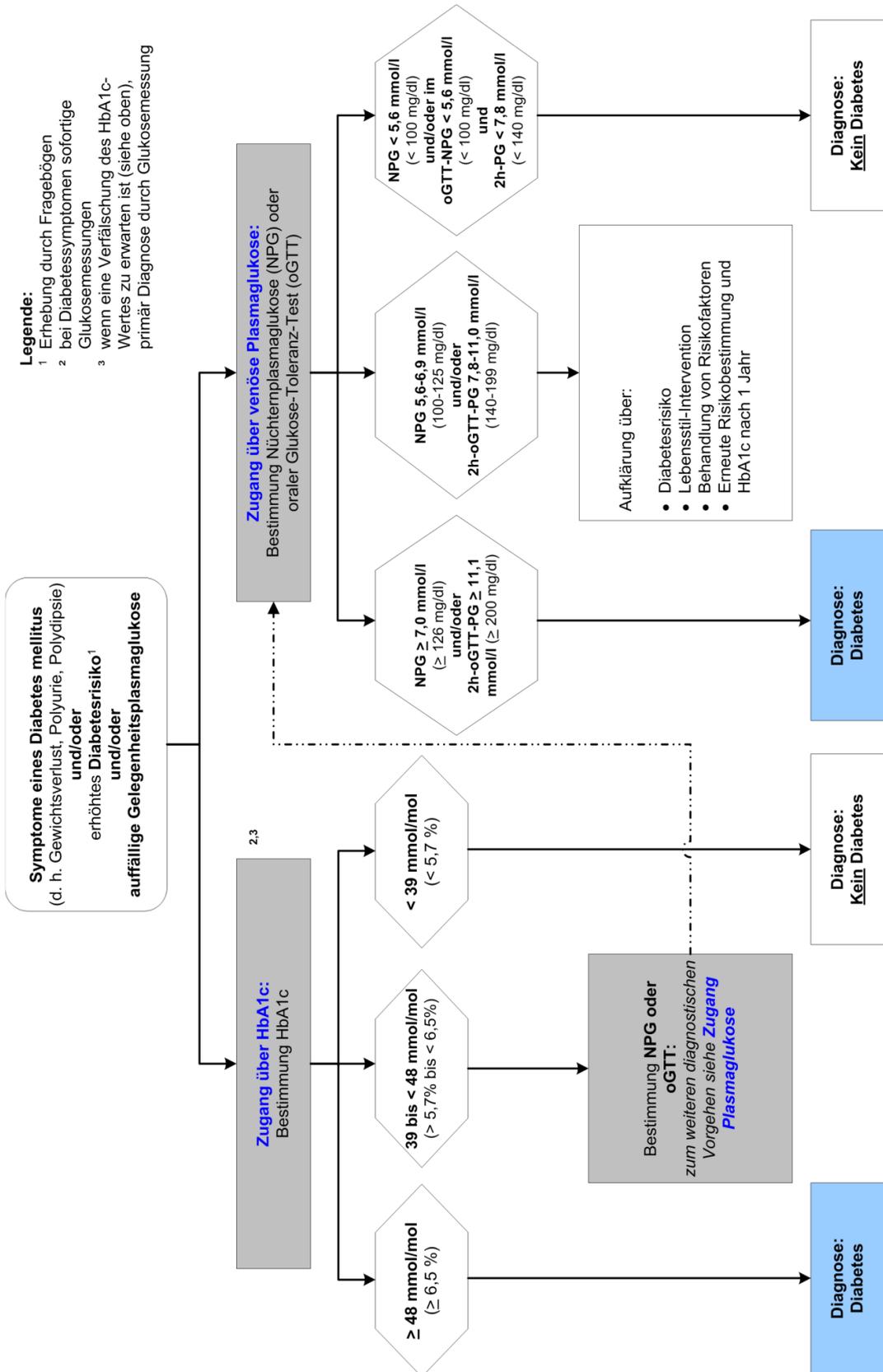


Abbildung 2: Schema zur Überprüfung einer Diabetes Diagnose
 Quelle: Bundesärztekammer, Kassenärztliche Bundesvereinigung, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften Nationale Versorgungs Leitlinie Therapie des Typ-2-Diabetes. Kurzfassung. 1. Auflage, Version.

1.4 Arteriosklerose und weitere mit Diabetes Mellitus assoziierte Erkrankungen

In Tabelle 1 sind die wichtigsten möglichen Spätfolgen eines Diabetes Mellitus aufgeführt und kurz erörtert. Dabei sind Mikro- als auch Makroangiopathien häufig ein Resultat aus chronischen Hyperglykämien. Mikroangiopathien werden statistisch häufiger bei Typ 1 Diabetikern und Makroangiopathien eher bei Typ 2 Diabetikern beobachtet [28].

Bei der Arteriosklerose löst oxidativer Stress eine chronische Entzündung der Gefäßwand aus, wodurch das Endothel aktiviert wird und sich dort Monozyten anlagern können [29]. Die Monozyten differenzieren sich an den entzündeten Stellen zu Makrophagen, die wiederum in den subendothelialen Raum der Gefäßwände eindringen, dort eingelagerte Lipide phagozytieren und sich so zu Schaumzellen entwickeln [30]. Diese auch als „fatty streaks“ bezeichneten histologischen Korrelate spielen eine wichtige Rolle in der Plaquebildung und der damit verbundenen Stenosierung der Gefäße [31]. Bei diesen Prozessen spielen Integrine, insbesondere Integrin $\beta 2$ und $\beta 1$, durch Modulation der Monozytenadhäsion an die Gefäßwand eine fundamentale Rolle [32, 33]. Diabetiker haben dabei ein besonders hohes Risiko, eine Arteriosklerose zu entwickeln [28].

Zu den makroangiopathischen Veränderungen zählen die pAVK, KHK, Insult und die Mönckeberg-Mediasklerose. Die anderen Veränderungen zählen eher in die Gruppe der mikroangiopathischen Veränderungen, obwohl die Übergänge oft fließend sind.

Tabelle 1: Übersicht über die Folgeerkrankungen des Diabetes Mellitus.

<u>Erkrankung</u>	<u>Beschreibung</u>
<i>Formenkreis der Makroangiopathien</i>	
<i>pAVK</i>	Progrediente Stenosierung der arteriellen Arm- und Beinarterien mit multifaktorieller Pathophysiologie [34]
<i>KHK</i>	Progrediente Stenosierung der koronaren Gefäße mit möglicher chronischer Myokardminderperfusion [35]
<i>Herzinfarkt</i>	Akute Myokardischämie mit möglicher resultierender Nekrosen, bedingt durch eine Minderperfusion [36]

<i>Insult</i>	Minderperfusion der Gehirnzellen mit akuter zerebraler Ischämie [37]
<i>Formenkreis der Mikroangiopathien</i>	
<i>Diabetische Retinopathie</i>	Häufigste Mikroangiopathie bei Diabetikern mit resultierender Visuseinschränkung durch Glykierung von Eiweißen und Lipiden mit resultierender Minderperfusion der Retina [38]
<i>Diabetische Nephropathie</i>	Mikroangiopathie mit resultierender nodulärer Sklerose und dem Symptomkomplex aus Albuminurie, Hypalbuminämie und Hyperlipidämie [39]
<i>Diabetische Neuropathie</i>	Einlagerung glykierter Metabolite in periphere Nerven mit progredienten Funktionsverlusten durch strukturelle Umbauprozesse sowie Minderperfusion [40]
<i>Arteriosklerose</i>	Stenosierende Gefäßveränderungen durch chronische Hyperglykämie [41]
<i>Diabetisches Fußsyndrom und Charcot-Fuß</i>	Syndrom bestehend aus schlecht heilenden Hauterosionen, herabgesetzten Fußpulsen und Sensibilitätsverlust der Füße mit multifaktorieller Ätiologie [42] Charcot-Fuß als Sonderform: Pathologische Frakturen der Fußknochen mit Osteolysen und Demineralisation [43]
<i>indirekte Folgeerkrankungen des Diabetes Mellitus</i>	
<i>Diabetische Kardiomyopathie</i>	Myokarderkrankungen mit mechanischen und / oder elektrophysiologischen Funktionsstörungen mit zum Teil noch unklarer Ätiologie [44]
<i>Steatosis hepatis</i>	Pathologisch gesteigerte Einlagerung von Triglyceriden in > 50 % der Hepatozyten mit einem Gesamtgewicht der Triglyceriden von > 10 % des Lebergewichts [22]

1.5 Arteriosklerose und das Immunsystem - Monozyten und Makrophagen

Das Immunsystem spielt im Organismus die wichtigste Rolle für die Abwehr von Bakterien, Viren und Parasiten. Es bekleidet aber auch eine Schlüsselrolle in der Entstehung der Arteriosklerose. Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über das menschliche Immunsystem gegeben und besonders die Rolle der Monozyten und Makrophagen erläutert, da diese ein wichtiger Teil der Pathogenese der Arteriosklerose sind. Das Immunsystem kann nach verschiedenen Klassifikationen unterteilt werden. Ein gängiges Modell ist die Unterteilung in das zelluläre und das humorale Immunsystem (Tabelle 2).

Tabelle 2: Klassifikation des Immunsystems nach der humoralen und zellulären Komponente.

<u>Klassifikation</u>	<u>Bestandteile</u>
<i>Humorales Immunsystem</i>	Antikörper Zytokine Komplementfaktoren T- und B-Lymphozyten Natürliche Killerzellen
<i>Zelluläres Immunsystem</i>	Granulozyten Dendritische Zellen Makrophagen und Monozyten

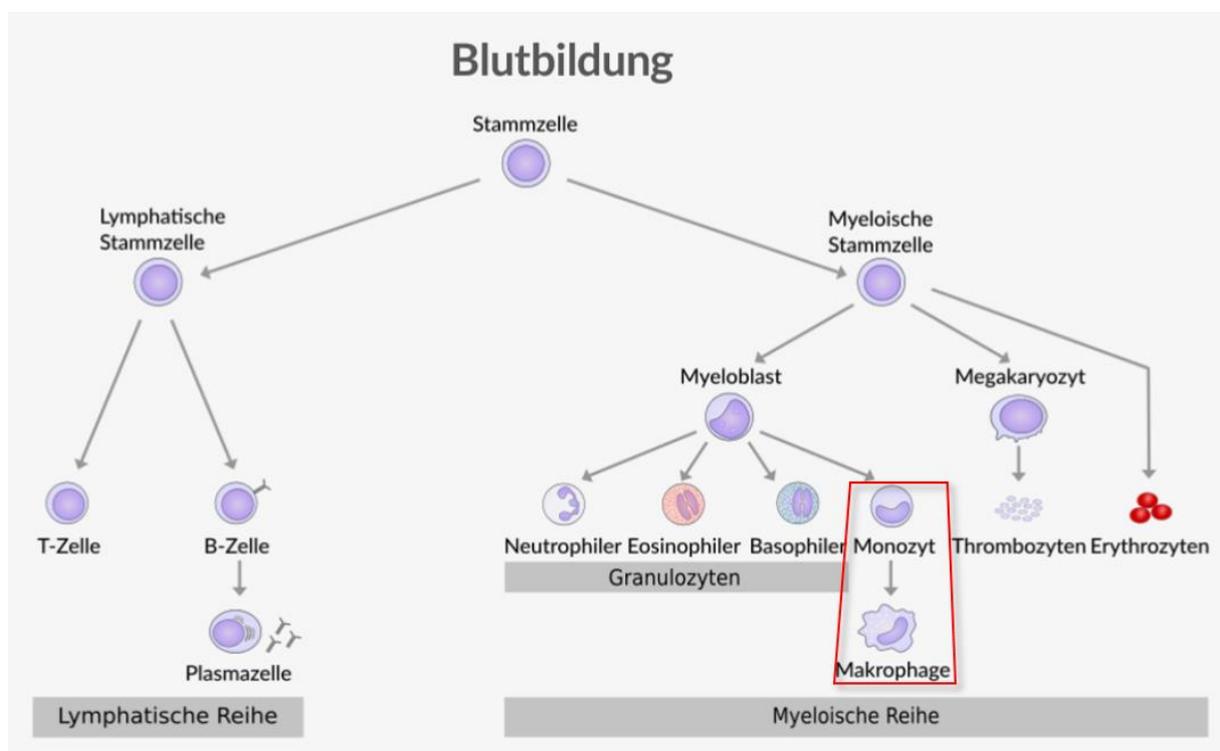
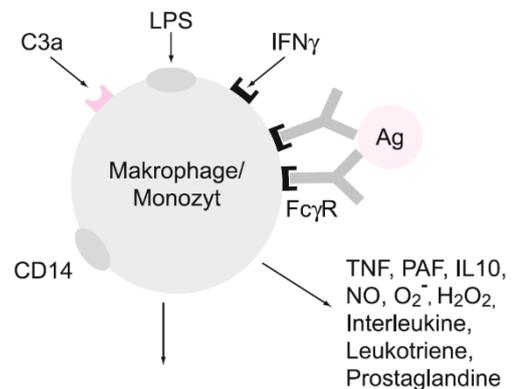


Abbildung 3: Übersicht über die Blutbildung: Quelle: Amboss GmbH, Salimi, M., Salimi, N., 2017, Neoplasien der Blutzellen Teil 1.

Wie in Abbildung 3 ersichtlich, stammen sowohl die Makrophagen als auch die Monozyten von der myeloischen Stammzelle ab. Sie sind Teil des zellulären Systems. Die myeloische Stammzelle kann sich in einen Myeloblasten, Megakaryozyten oder in Erythrozyten differenzieren. Aus dem Myeloblasten können die Granulozyten und die Monozyten hervorgehen. Der Monozyt wiederum kann sich zu einem Makrophagen, einer Mastzelle oder weiteren Zelltypen differenzieren. Dieses System aus Makrophagen und Monozyten wurde historisch auch als retikulohistiozytäres System bezeichnet [22]. Dabei wandern die Monozyten meist in das Gewebe ein, nachdem sie nur eine kurze Zeit im Blut zirkulieren. Sie differenzieren sich dort zu gewebständigen Makrophagen, die sich beispielsweise zu Alveolar- oder Peritonealmakrophagen, in Kupffer'sche Sternzellen in der Leber oder in Mikrogliazellen im Gehirn weiter differenzieren können. Es gibt mehrere Subpopulationen der differenzierten Makrophagen. Es wird der klassisch aktivierte M 1 Makrophage vom alternativ aktiviertem M 2 Makrophagen unterschieden. Diese Einteilung ist ein orientierendes System und spiegelt daher nicht die große Variabilität *in vivo* wider [45]. Der proinflammatorische M 1 Makrophage entwickelt sich durch eine Stimulation mit beispielsweise LPS oder IFN γ [46]. Hingegen werden anti-inflammatorische M 2 Makrophagen durch multiple Aktivatoren differenziert und bilden somit eine heterogene Gruppe mit unterschiedlichen Eigenschaften [47]. Die Hauptaufgabe aller Makrophagen besteht in der Phagozytose von verschiedenen Stoffen, wie beispielsweise apoptotischer Zellen, Fremdmaterial oder Erreger. Des Weiteren sind sie in der Lage, toxische Substanzen und Entzündungsmediatoren zu sezernieren [48].

Abbildung 4 zeigte eine Übersicht über die wichtigsten Aktivatoren und Funktionen von Monozyten und Makrophagen. Zu den Aktivatoren zählen LPS, IFN γ , C3a und der Fc γ -Rezeptor. C3a ist ein Teil des Komplementsystems, das wiederum Teil des humoralen Immunsystems ist. Über den Fc γ -Rezeptor können Antikörper der IgG-Klasse erkannt und über deren Aktivierung die phagozytotische Aktivität der Makrophagen aktiviert werden [49]. Nach Aktivierung können eine Vielzahl von Mediatoren und Zytokinen freigesetzt werden. Zu diesen Mediatoren gehören sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Mediatoren, pro- oder anti-koagulatorische Mediatoren, Prostaglandine, Leukotriene, angiogenesestimulierende Faktoren, plättchenaktivierender Faktor (PAF), Wachstumsfaktoren und der Colony-stimulating factor (CSF), der im Knochenmark die Produktion von Zellen aus der hämatopoetischen Reihe fördert. Zudem führt eine Aktivierung von Makrophagen zur Produktion von Sauerstoffradikalen, die sowohl in der Immunabwehr gegen Erreger eine elementare Rolle spielen als auch in der Pathogenese der Arteriosklerose [50]. Des Weiteren exprimieren fast



Antigenpräsentation
Komplement- und Gerinnungsfaktoren,
VEGF, Hormone, Adhäsionsmoleküle,
Wachstumsfaktoren, Phagozytose

Abbildung 4: Schütt C, Bröker B (2009) *Grundwissen Immunologie*, 2. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

ausschließlich Monozyten und Makrophagen das CD 14 Protein. Es ist ein Oberflächenprotein, das einen Teil eines Rezeptorkomplexes für TNF α bildet und so zum Teil die pro-inflammatorische Wirkung von TNF α vermittelt [51]. Daher eignet sich das CD 14 zur Selektion von Monozyten aus humanen Proben.

1.5.1 Zytokine – Botenstoffe des Immunsystems

„Zytokine sind regulatorische Proteine, die von Leukozyten und einer Reihe weiterer Zellen“ – vor allem Makrophagen – „produziert werden; die pleiotropen Funktionen der Zytokine schließen zahlreiche Effekte auf Zellen des Immunsystems und die Regulierung entzündlicher Prozesse ein.“ [52]

Allgemein sind Zytokine eine sehr heterogene Gruppe aus Peptiden, die man in mehrere Subgruppierungen unterteilen kann. Dazu gehört die Differenzierung in Interleukine, Interferone, kolonienstimulierende Faktoren, Wachstumsfaktoren, transformierende Wachstumsfaktoren, Chemokine, Virokine und die Tumornekrosefaktoren [52]. Die meisten Zytokine, außer TNF α und Interleukin 1, wirken autokrin, parakrin und juxtakrin und somit ausschließlich lokal begrenzt. Primär besteht die Aufgabe der Zytokine in der Vermittlung einer Immunantwort auf einen spezifischen oder unspezifischen Reiz. Zudem spielen einige Zytokine eine wichtige Rolle bei der Ontogenese, der Gewebereparatur und Zellapoptose, sowie bei der Kontraktilität von Gefäßen und der kardialen Inotropie. Die Subgruppen werden noch weiter unterteilt. Beispielsweise werden die Interferone in die Typ-I und Typ-II Interferone differenziert. Zu den Typ-I Interferonen gehören IFN- α , IFN- β , IFN- τ , IFN- ω , und zu den Typ-II-Interferonen gehört IFN- γ . Die Typ-I Interferone wirken vor allem antiviral, wobei die Typ-II Interferone sowohl antiviral als auch immunmodulatorisch wirken. IFN γ wird hauptsächlich von CD 4 +, CD 8 +, CD 28 + T-Lymphozyten, natürlichen Killerzellen, dendritischen Zellen und Makrophagen produziert [53]. Die Effektorzellen sind sehr vielfältig. Zu ihnen gehören beispielsweise Granulozyten, Lymphozyten, Makrophagen und die T-Lymphozyten selbst. Dabei ist IFN γ der wichtigste Aktivator der Makrophagen [48]. Es stimuliert den intrazellulären Abbau von phagozytierten Bakterien in Makrophagen durch die gesteigerte Fusionsbereitschaft von Phagosomen mit den Lysosomen. Der „oxidativ Burst“ und der damit verbundene oxidative Stress durch die Sekretion von reaktiven Sauerstoffradikalen werden durch IFN γ getriggert [54]. Somit eignet sich die Messung von Zytokinen, um eine Reaktion der Makrophagen zu qualifizieren und sogar zu quantifizieren.

Kultivierte humane Immunzellen können mit artifiziellen Agentien stimuliert werden, wie beispielsweise mit LPS, PMA oder IFN- γ . Das Lipopolysaccharid (LPS) ist ein Oberflächenprotein, das auf der Außenseite der Zellmembran von gram-negativen Bakterien vorkommt und stellt einen starken pro-inflammatorischen Stimulus für viele Immunzellen, besonders für die Makrophagen, dar [55]. Dabei wirkt LPS hauptsächlich über das von Makrophagen und Monozyten exprimierte CD 14

Oberflächenmolekül. LPS kann in hohen Konzentrationen direkt am CD 14 wirken oder bei geringeren Konzentrationen seine Affinität zum CD 14 durch das LPS-bindende Protein steigern [55, 56]. Des Weiteren kann die Wirkung von LPS auch über einen Rezeptor der Toll-like Familie vermittelt werden, vor allem über den TLR4. LPS wirkt konzentrationsabhängig auf die Produktion von verschiedenen Zytokinen der Makrophagen, aufgrund einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB und einer Vielzahl verschiedener intrazellulärer Signalwege [57]. Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) ist ein starker Aktivator der Proteinkinase C, da es Strukturähnlichkeiten mit dem natürlich vorkommenden Diacylglycerin zeigt [58, 59].

Um nach Stimulation der humanen Makrophagen die biochemische Reaktion zu quantifizieren, gibt es eine Reihe von Zytokinen, deren Produktion und Sekretion bestimmt werden können. Ihre primäre Aufgabe ist die Chemotaxis, was bedeutet, dass diese Stoffe die Immunzellen zu den inflammatorisch aktiven Orten leiten und ihre Diapedese ins Gewebe erleichtern und somit die lokale Immunaktivität um ein Vielfaches erhöhen. Allerdings bedarf es dazu ein Zusammenspiel von Integrinen, Immunglobulinen und Selektinen mit den Chemokinen.

1.5.2 MPO

Die Myeloperoxidase ist ein Enzym, das v. a. in neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Monozyten vorkommt [60] und dort die Oxidation von Chloridionen und Bromionen mit Hilfe von Wasserstoffperoxid katalysiert. Daraus entstehen unter Bildung von Chlor, Brom sowie Bromchlorid hypochlorige und hypobromige Säuren. Die Produkte spielen eine wichtige Rolle beim „oxidativ Burst“ in der Immunabwehr, da sie bestimmte Moleküle von Erregern oxidieren und somit funktionsunfähig machen [61]. Zudem oxidiert es aber auch Edukte, die ungesättigte Doppelbindungen oder bestimmte andere Eigenschaften aufweisen. Ein Beispiel ist das cholesterinreiche Low-density Lipoprotein (LDL), das auch in der Pathophysiologie der Arteriosklerose eine wichtige Rolle spielt. Daraus resultiert, dass MPO nicht nur bei Infektionskrankheiten, sondern auch bei nicht infektiösen Erkrankungen, besonders bei der Arteriosklerose, eine elementare Rolle spielt [62, 63, 64].

Bei Patienten, die an einem Diabetes Mellitus Typ 2 erkrankt sind oder Patienten mit einer stabilen oder instabilen KHK können erhöhte MPO-Werte gemessen werden [65, 66]. Selbst bei Patienten mit einer Insulinresistenz ohne einem manifesten Diabetes Mellitus können erhöhte MPO-Werte gemessen werden, wenn eine familiäre diabetische Vorbelastung anamnestisch eruierbar ist [67, 68].

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Zielsetzung dieser Arbeit war es, den Einfluss des RS 5918 Polymorphismus des Integrin β 3 bei Patienten mit Diabetes Mellitus auf klinische und laborchemische Befunde sowie die inflammatorische Aktivität von Makrophagen *in vitro* zu untersuchen.

2. Methodenteil

2.1 Rechtliches und Allgemeines

Der Ethikantrag mit der Kennziffer E242/14 einschließlich der Patienteninformation zu dieser Studie wurde am 11.06.2015 von der Ethikkommission des Saarlandes bewilligt. Alle Teilnehmer haben eine schriftliche Einwilligung in die Studie gegeben. Das Patienteninformationsblatt und die Einverständniserklärung befinden sich im Anhang.

2.2 Patientenrekrutierung und Datenerhebung

Die in die Studie aufgenommenen Diabetiker mussten folgende Einschlusskriterien erfüllen:

- Einwilligung zur Teilnahme an der Studie mit grundlegendem inhaltlichem Verständnis
- Frauen und Männer ab 18 Jahren
- Patienten mit einem leitliniengerecht gesicherten Diabetes Mellitus

Folgende Ausschlusskriterien führten zu einem kategorischen Ausschluss von der Studie:

- Bekanntes aktives Tumorleiden
- Kachexie (BMI < 18 kg/m²)
- Akuter Infekt

Für den zweiten Teil der Studie, der Monozytenkultivierung, wurden ausgewählte Patienten nach ihrer Zustimmung ein weiteres Mal in die Praxis einbestellt, um eine Blutprobe zur Monozytengewinnung zu entnehmen.

Liste der teilnehmenden Praxen:

- Dr. Wenzl und Dr. Wenzl-Bauer, Rehlingen-Siersburg (Diabetologie)
- Dr. Nenno, Völklingen (Allgemeinmedizin)
- Dr. Giersberg, Merzig (Allgemeinmedizin)
- Dr. Teja, Kirkel (Allgemeinmedizin)
- Dr. Stamm, Saarbrücken (Endokrinologie)

Alle verwendeten Daten stammten aus den Patientenakten. Es wurden im Rahmen dieser Studie keine separaten klinischen Befunde erhoben. Auch wurden keine zusätzlichen Laborparameter in der Routine der Patienten bestimmt, sondern die Ergebnisse aus den Patientenakten verwendet. Hier wurden nur gesicherte Diagnosen aufgenommen und ausgewertet. Verdachtsdiagnosen wurden nicht berücksichtigt. Eine Quelldokumentation über die erhobenen Daten wurde nicht angelegt.

2.3 DNA-Isolation

Die DNA-Isolation erfolgte aus 5 ml EDTA-Vollblut, das für maximal 4 Wochen bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurde. Es wurde das „QIAamp DNA Blood Mini Kit“ von QIAGEN® benutzt. Die Kit-Komponenten wurden nach Herstellerangaben gelagert. Die unten aufgeführten Puffer waren im Kit enthalten.

Im ersten Schritt wurden 200 μl der Vollblutprobe mit 20 μl QIAGEN® Protease gemischt und dazu 200 μl Puffer AL gegeben. Das Gemisch wurde für 15 s vermischt und anschließend für 10 min bei $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf einem Heizschüttler inkubiert, um die Zellen zu lysieren. Nach der Zugabe von 200 μl Ethanol (100 %) und erneutem Vortexen wurde das Gemisch in eine Zentrifugationssäule gegeben, die eine semipermeable Membran enthielt und anschließend bei 6 000 g für 1 min zentrifugiert. Dabei adhärte lediglich die DNA an der Siliziumoxidmembran, sodass sie von den restlichen Blutbestandteilen effektiv getrennt werden konnte. Darauf folgten zwei Waschschrte, indem 500 μl AW1-Puffer auf die Membran gegeben und bei 6 000 g für 1 min zentrifugiert wurde. Die Durchflüsse wurden in jedem Zentrifugationsschritt verworfen. Der zugehörige zweite Waschschrte erfolgte unter Hinzugabe von 500 μl AW2-Puffer mit anschließender Zentrifugation bei 20 000 g für 3 min bei Raumtemperatur (RT). Um sicher zu stellen, dass die Membran keine Rückstände der Waschpuffer mehr enthielt, wurde bei Höchstgeschwindigkeit für 1 min zentrifugiert. Um die DNA aus der Membran zu lösen, wurde die Membran für 1 min mit 200 μl AE-Puffer inkubiert und anschließend für 1 min bei 6 000 g bei RT zentrifugiert. Die Lagerung des entstandenen Eluates mit der aufgereinigten DNA erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.4 Quantifizierung der vorhandenen DNA in den Blut-Proben

Die Messung der Konzentration und Reinheit der isolierten DNA erfolgte mit Hilfe eines NanoDrop Spektrometers durch Messung der Auslenkung eines Lichtstrahls, der durch die isolierte DNA geleitet wurde. Dieser wird durch eine gepulste Xenon-Lampe mit einer Wellenlänge von 260 nm emittiert. Durch den Winkel der Ablenkung kann das Gerät die Quantität der DNA Probe bestimmen. Um die Qualität der Probe zu beurteilen, wird die Auslenkung bei verschiedenen Wellenlängen gemessen und daraus Quotienten errechnet, mit denen sich die Reinheit der Probe bestimmen und vergleichen lässt. Die aussagekräftigsten Quotienten sind 260/280 und 260/230. Proteine können bei 280 nm detektiert werden, sodass der erste Wert den Verunreinigungsgrad mit Proteinen reflektiert. Der zweite Wert 260/230 hat Aussagekraft über die Verunreinigung mit anderen Stoffen, beispielsweise Peptide oder Kohlenhydrate. In einer reinen Probe liegt dieser Wert bei 1,8 - 2,2. Für die Quantifizierung und Qualitätsbeurteilung der Proben sind Messungen eines Standards zur Definition eines Nullwertes erforderlich.

Nach Initiierung des Systems erfolgte vor und nach den Messungen der Proben jeweils eine Messung des reinen AE Puffers, um sicher zu gehen, dass die Proben nicht verunreinigt wurden. Die Messung erfolgte gemäß der Betriebsanleitung mit 1 µl der aufgereinigten DNA [69].

2.5 Real-time PCR und Genotypisierung

Die klassische Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase chain reaction; kurz PCR) ist ein Verfahren zur Vervielfältigung der DNA. Dies ist notwendig, da die Konzentration der isolierten DNA aus dem Patientenblut für eine allelische Diskriminierung zu gering ist. Ziel der Genotypisierung war die Identifikation von Patienten mit dem Leu33Pro Polymorphismus (RS 5918). Die PCR besteht aus drei Prozessen, die wiederholt hintereinander ablaufen: Denaturierung, Hybridisierung und Elongation. Dabei ist darauf zu achten, dass Primer, Nucleotide und Taq-Polymerase in ausreichender Menge zur Verfügung stehen.

1. Denaturierung

Um die DNA zu vervielfältigen, muss die doppelsträngige DNA denaturiert werden, indem die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Strängen zerstört werden.

2. Hybridisierung

Die Primer können sich nun an ihre komplementären DNA-Abschnitte der Einzelstränge anlagern. Primer sind kleine, industriell hergestellte DNA-Bausteine, die spezifisch nach dem zu vervielfältigenden Genabschnitt ausgewählt werden.

3. Elongation

Um den komplementären DNA-Strang neu zu synthetisieren, fügt die Taq-Polymerase freie Nucleotide in 5'-3' Richtung an den Primer an. Diese Polymerase kommt in ähnlicher Form auch *in vivo* vor, jedoch hat die humane Polymerase ein tieferes Temperaturoptimum. Der Primer verbleibt in der DNA und wird nicht wieder ausgebaut.

Wenn sich nach den drei genannten Schritten die DNA verdoppelt hat, beginnt der Zyklus erneut. Insgesamt besteht diese PCR aus 40 Zyklen, bei denen exponentiell amplifiziert wurde. Eine Übersicht über die verwendeten Temperaturen und Zeitintervalle ist in Tabelle 3 gezeigt.

Im Gegensatz zur klassischen PCR wird bei der Real-time PCR eine fluoreszenzmarkierte DNA-Sonde verwendet, die bei Bindung an die DNA und Anregung ein Signal emittiert und deren Fluoreszenz in Echtzeit gemessen wird. Diese Emission erfolgt nur bei vollständiger, also spezifischer Bindung an der korrespondierenden DNA und kann somit als Messwert für die Quantität einer bestimmten Gensequenz genutzt werden. Wenn der Quencher in der räumlichen Nähe des Reportermoleküls ist, unterdrückt der Quencher das emittierte Signal. Sobald nun die räumliche Nähe des Reporters zum Quencher durch die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase aufgehoben wird, kann der Reporter ein messbares Signal

nach Anregung emittieren (Abbildung 5). Die Sonde wird dabei vollständig in ihre Nukleotide zerlegt. Dazu wurden zwei fluoreszierende Sonden, VIC® und FAM, die spezifisch unter Emission eines Signals an die jeweilige mutierte bzw. nichtmutierte Sequenz binden, verwendet. Die VIC®-Sonde bindet an die Sequenz mit Cytosin, also an den zu suchenden Polymorphismus, während die FAM-Sonde an die Sequenz mit Thymin, also den Wildtyp bindet. Ein Vergleich der Basenfolge zwischen dem Wildtyp und dem gesuchten Leu33Pro Polymorphismus ist in Tabelle 4 zu sehen.

Tabelle 3: Ablauf der Real-Time PCR mit zugehörigen Temperaturen und Zeitspannen. Schritte 3 und 4 wurden dabei insgesamt 40 Mal wiederholt.

<u>Schritt</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Dauer</u>
1.	25 °C	1 min
2.	95 °C	20 s
3.	95 °C	3 s
4.	60 °C	30 s
5.	25 °C	1 min

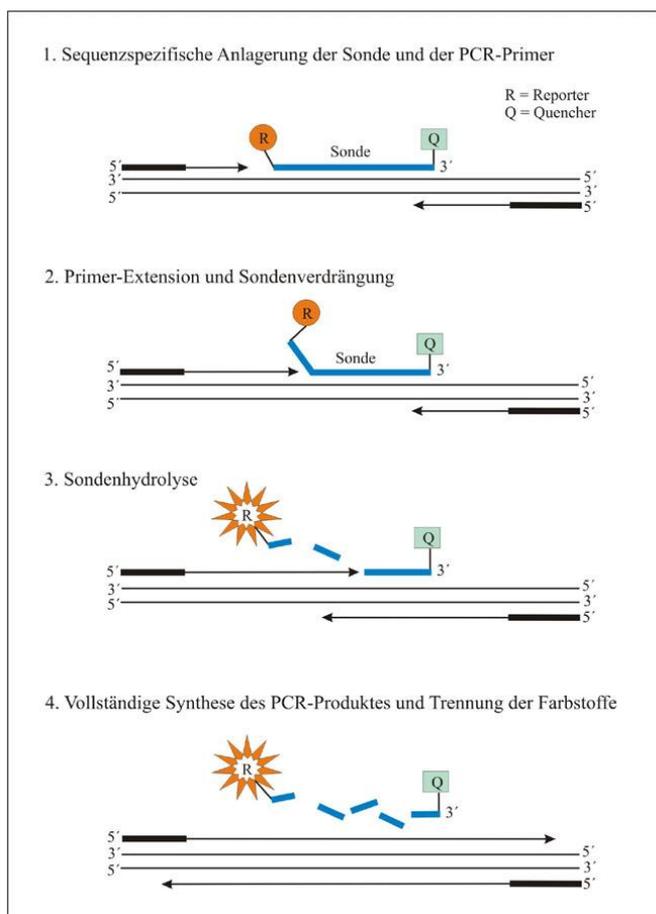


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Funktionsweise der Signalemission durch das Reporter-molekül. Im ersten Schritt lagert sich die Sonde an die DNA an. Anschließend wird die Sonde durch die Taq-Polymerase in Schritt zwei verdrängt und kann somit in Schritt drei ein Signal emittieren, bevor sie in Schritt vier komplett hydrolysiert wird. Quelle: <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/jacob-daniela-2003-07-15/HTML/chapter2.html>.

Tabelle 4: Sequenz aus dem Integrin $\beta 3$ Gen auf Chromosom 17. Der Polymorphismus wurde farblich markiert. Dabei definiert die Base Thymin an Position 1565 den Wildtyp und die Base Cytosin an der gleichen Position den Polymorphismus.

RS 5918	GCTCCTGTCTTACAGGCCCTGCCTC C GGGCTCACCTCGCTGTGACCTGAAG
Wildtyp	GCTCCTGTCTTACAGGCCCTGCCTC T GGGCTCACCTCGCTGTGACCTGAAG

Zum Genotypisieren wurden 96-Loch Platten mit einem Probevolumen von insgesamt 10 µl verwendet. Zunächst wurde das Reaktionsgemisch hergestellt, dessen Zusammensetzung in Tabelle 5 aufgelistet ist. Zur Analyse wurden 2 µl der isolierten DNA mit einer Konzentration von [20-40 ng/µl] pro Kavität hinzugegeben.

Pro Platte wurden vier Kontrollproben angelegt: eine Standard-Negativkontrolle ohne DNA mit DNase freiem H₂O und Mastermix, dazu jeweils eine Positivkontrolle jeder Patientengruppe (Wildtyp, Heterozygot, Homozygot). Nach dem Pipettieren des Reaktionsgemisches und der Proben wurde die Platte luftblasenfrei mit einer durchsichtigen Folie abgedeckt und für 2 min bei 300 g zentrifugiert. Zur Analyse wurde das Fast-Real-Time-PCR Gerät 7500 von Applied Biosystems® verwendet. Ein exemplarisches Ergebnis ist in Abbildung 6 gezeigt.

Tabelle 5: Bestandteile des Master-Mix mit einem Gesamtvolumen von 8 µl.

<u>Volumen pro Kavität</u>	<u>Substanz</u>
5 µL	2X TaqMan® GTXpress™ Master Mix
0,25 µL	40X SNP-Assay Working Stock; RS 5918
2,75 µL	DNase freies H ₂ O

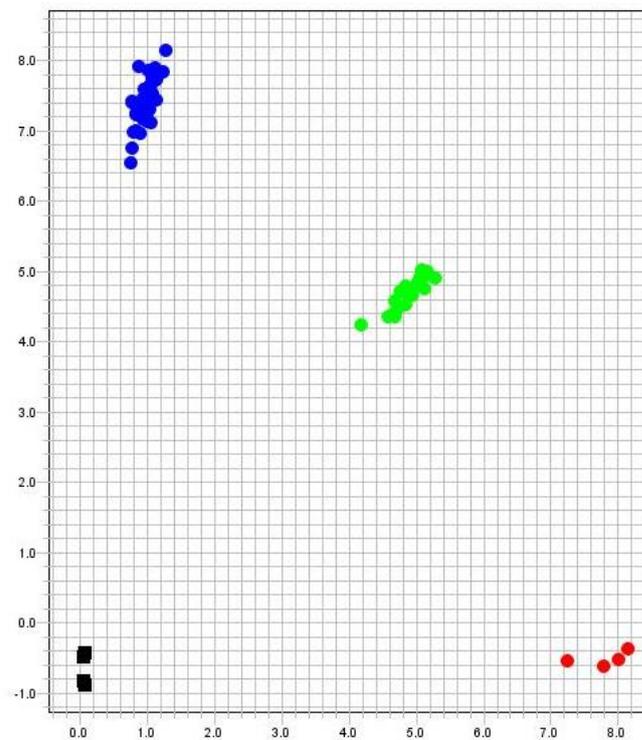


Abbildung 6: Ergebnis der allelischen Diskriminierung. Auf den Achsen ist die Stärke des Signals aufgetragen (dimensionslose Kennzahl), das von den Sonden emittiert wird. Auf der x-Achse ist dabei das Signal für Allel eins aufgetragen und korrespondierend dazu auf der y-Achse das Signal für Allel zwei. Die roten Punkte (VIC-Sonde) zeigen das Vorhandensein eines homozygoten Genotyps, die grünen Punkte das Vorhandensein eines heterozygoten Genotyps und die blauen Punkte (FAM-Sonde) das Vorhandensein eines Wildtyps. Die schwarzen Punkte sind Negativkontrollen.

2.6 Monozytenisolation und Quantifizierung

Die Monozytenisolation erfolgte aus 10 ml frischem EDTA-Vollblut, das gut durchmischt bei Raumtemperatur transportiert wurde. Dabei wurde eine Transportzeit zwischen Blutentnahme beim Patienten und Beginn der Monozytenisolation von 4 h nicht überschritten, um die Vitalität der Zellen nicht zu gefährden. Es wurde darauf geachtet, dass bei der peripher-venösen Blutentnahme nicht zu schnell aspiriert wurde, um Turbulenzen und den damit verbundenen Stress für die Zellen zu minimieren. Eine geringe Stauzeit bei der Blutentnahme sollte einer Zellyse vorbeugen. Die Isolation der Monozyten erfolgte nach Herstellerangaben mit dem „Whole Blood Column Kit“ der Firma Miltenyi®.

Zur Kontaminationsvermeidung erfolgten alle Arbeitsschritte unter einer sterilen Werkbank. Im ersten Schritt wurden 10 ml EDTA-Vollblut mit 500 µl supramagnetischen Partikeln, die an CD 14⁺ Antikörper gekoppelt waren, für 15 min bei 4 °C auf einem Rollmischer inkubiert, da die zu isolierenden Monozyten selektiv CD 14 exprimieren (Abbildung 7 A). Anschließend wurde das Gemisch nach Zugabe von 50 ml Separationspuffer (PBS mit 5 mM EDTA und 0,5 % BSA) bei 445 g für 10 min ohne Bremse zentrifugiert, um die korpuskulären Blutbestandteile von dem Rest zu trennen. Der Überstand wurde verworfen und der verbleibende Anteil mit Separationspuffer auf ein Gesamtvolumen von mindestens 10 ml aufgefüllt. Um Zellklumpen zu entfernen, wurde die Probe mit Hilfe eines Nylonnetzes mit einer Netzstärke von 40 µm filtriert. Während die Probe durch den Filter lief, wurde die Separationssäule im Magnetfeld des Zellseparators platziert und mit 3 ml Separationspuffer gespült. Anschließend wurde die Säule mit der filtrierten Probe befüllt, um die Zellen mit einer magnetischen Positivselektion zu separieren, wobei die CD 14⁺ markierten Zellen, im Gegensatz zu den nichtmarkierten Zellen, in der Säule hafteten (Abbildung 7 B). Um CD 14⁻ Zellen zu entfernen, wurde die Säule drei Mal mit jeweils 3 ml Separationspuffer gewaschen. Dabei war darauf zu achten, dass die Vorratsbehälter der Säulen zwischen den Waschschritten vollständig leerliefen, um eine optimale Selektion zu erzielen. Im Anschluss an die Waschschriffe wurde die Säule samt gebundenen CD 14⁺ Zellen aus dem Magnetfeld entfernt und die Zellen unter manuellem Druck mit Hilfe eines Kolbens und 5 ml Eluationspuffer aus der Säule gepresst (Abbildung 7 C). Im letzten Schritt wurde die Zellsuspension bei 300 g für 5 min zentrifugiert und die Zellen in 4 ml X-VIVO Medium (+ Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) [100 ng/ml]) resuspendiert.

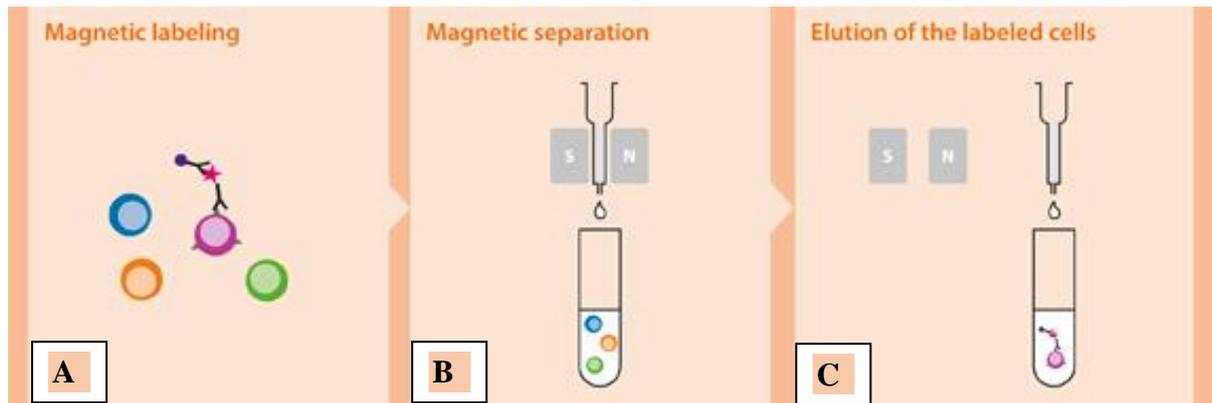


Abbildung 7: Schematische Darstellung der CD 14 Positivselektion mithilfe der magnetischen Partikel. Die CD 14⁺ Zellen werden über Antikörperbindungen magnetisch markiert und haften an den Metallkugeln im Magnetfeld der Säule. Nach drei Waschschritten werden die markierten CD 14⁺ Zellen von den Metallkugeln durch Herausnehmen aus dem magnetischen Feld und Spülung mittels AE Puffers eluiert. Quelle: MACS Miltenyi Biotec, Select the best brochure (2015), Miltenyi Biotec GmbH, 130-091-618.15.

Um eine möglichst konstante Zellzahl in jedem Ansatz zu kultivieren, war eine Quantifizierung der Gesamtzellzahl der isolierten CD 14⁺ Zellen notwendig. Dazu erfolgte die Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe eines automatischen Zellzählgerätes (Luna von Logos Biosystems®) mit einer Mischung aus 15 µl der Zellsuspension mit 15 µl Trypanblau. Im Gegensatz zu vitalen Zellen kann Trypanblau die Membran toter Zellen passieren. So konnte der Funktionszustand der Zellen am Färbemuster abgeschätzt werden.

2.7 Kultivierung der Monozyten und Ausdifferenzierung zu Makrophagen

Ziel der Kultivierung der Monozyten war es, ihre Ausdifferenzierung zu Makrophagen zu erreichen. Dazu wurden mehrere in der Literatur etablierte Zellkulturmedien getestet, um die für diesen Versuchsansatz optimale Methode zu finden [70, 71]. Die Kultivierungszeit variierte protokollabhängig zwischen sieben bis elf Tagen. Zudem wurden 6–Loch Platten sowie 12–Loch Platten mit verschiedenen Zelldichten getestet. Die dabei getesteten Zelldichten variierten zwischen 200 000 bis 4 000 000 Zellen pro Kavität.

Es wurden folgende drei Ansätze getestet:

1. Eigenserum: Im ersten Ansatz wurde DMEM-Medium mit einem 10 % Eigenserum-Zusatz verwendet [72].
2. Humane Seren: Anschließend wurde zu RPMI 1640 Medium mit erworbenen humanen Seren (10 %) gewechselt. Dabei wurden Seren von drei Firmen getestet: (PAN Biotech, Capricorne, SIGMA), da sich die Zusammensetzung der humanen Seren und somit das Ergebnis der Zellkultivierung deutlich unterscheiden kann [73].

3. X-VIVO: Des Weiteren wurde X-VIVO™ 10 Medium mit einem M-CSF Zusatz [100 ng/ml] getestet. Diese Konzentration des M-CSF entspricht dabei der in der Literatur üblich verwendeten Mengen [74].

Standardmäßig wurden die Zellen in den späteren Versuchen mit X-VIVO™ 10 Medium mit 100 ng/ml M-CSF kultiviert. Dazu wurden die Zellen für acht Tage in einer 12-Loch Platte mit einer Konzentration von ca. 1×10^6 Zellen pro Kavität in 1 ml Medium ausgesät. Ein Mediumwechsel erfolgte 4 h nach Aussaat, um tote Zellen zu entfernen, da lebende Zellen an der Oberfläche der Kulturplatten adhärten. Am dritten und sechsten Tag erfolgten ebenfalls Mediumwechsel, um die Integrität der Zellen zu bewahren. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen (37 °C und 5 % CO₂) im Inkubator gelagert. Jeder Ansatz wurde mehrmals photographisch dokumentiert, um später Rückschlüsse auf das Wachstumsverhalten schließen zu können.

2.8 Charakterisierung der kultivierten Makrophagen durch Immunofluoreszenz

Die Zellen wurden nach erfolgreicher Ausdifferenzierung auf Glasplättchen mit einem Durchmesser von 15 mm und einer Stärke von 0,14 mm ausgesät. Dort wurden diese über Nacht kultiviert und konnten sich adhären. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml eiskaltem PBS gewaschen, für 15 min bei RT mit Roti-Histofix (4 %) fixiert und nachfolgend drei Mal mit 1 ml PBS gewaschen. Um unspezifische Antikörperbindungen zu minimieren, wurden die freien Bindungsstellen der Zellen für 30 min bei RT mit 500 µl PBS/BSA (1 %) blockiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 1 ml PBS wurden 200 µl Primäntikörperlösung auf die Glasplättchen gegeben und über Nacht in einer Feuchtkammer bei +4 °C inkubiert. Dabei kamen sowohl gekoppelte als auch nicht gekoppelte Primäntikörper zum Einsatz. Bei den bereits an den fluoreszenzmarkierten Sekundäntikörper gekoppelten Antikörpern entfielen die beiden folgenden Schritte (Waschen + Sekundäntikörper). Tabelle 6 zeigt eine Übersicht über die verwendeten Antikörper.

Die Glasplättchen wurden drei Mal mit 1 ml PBS gewaschen, anschließend 200 µl der Sekundäntikörperlösung auf die Glasplättchen pipettiert und für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurden die Glasplättchen erneut drei Mal mit 1 ml PBS gewaschen.

Die Zellen wurden mit 50 µl DAKO Eindeckmedium mit einem DAPI Zusatz (1:2000) auf Objektträgern eingedeckt, um die Zellkerne anzufärben. Die Präparate wurden zeitnah unter dem Fluoreszenzmikroskop bei verschiedenen Wellenlängen untersucht.

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Antikörper mit Angabe der Donorspezies, der Verdünnung und der Hersteller Nummer.

<u>Antigen</u>	<u>Donorspezies</u>	<u>Verdünnung in PBS/BSA</u> <u>(0,5 %)</u>	<u>Hersteller und Nummer</u>
<i>Integrin β 3</i>	Kaninchen monoklonal	1:100	Abcam, ab75872
<i>Alexa Flour® 488 goat anti rabbit</i>	Ziege polyklonal	1:500	Thermo Fisher, A11008
<i>EMRI (Alexa Fluor® 488)</i>	Ratte monoklonal	1:100	Abcam, ab204266

2.9 Überprüfung der Vitalität der kultivierten Makrophagen durch Dil markiertes oxLDL-Aufnahme

Physiologischerweise nehmen Makrophagen in vivo oxLDL auf und wandeln sich zu Schaumzellen um. Der Aufnahmeprozess diente hier zur Affirmation der Vitalität der Zellen. Deshalb wurden die Zellen mit einem lipophilen Fluorophor, der an das oxLDL gekoppelt war, inkubiert. Fluorophore verändern dabei nicht die Eigenschaften des oxLDL und leuchten dabei nicht von selbst. Sie müssen erst durch einen Lichtimpuls bei 488 nm Wellenlänge angeregt werden, um ein messbares Signal zu emittieren.

Dazu wurden die Zellen nach erfolgreicher Kultivierung und Ausdifferenzierung auf Glasplättchen mit einem Durchmesser von 15 mm und einer Stärke von 0,14 mm ausgesät und anschließend für 48 h mit 20 μ g/ml Dil-oxLDL (im zusatzfreien Medium) im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden drei Mal mit jeweils 1 ml eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit Roti-Histofix (4 %) für 15 min bei RT fixiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 1 ml PBS wurden die Glasplättchen mit 50 μ l DAKO Eindeckmedium mit einem DAPI Zusatz (1:2000) auf Objektträgern eingedeckt, um die Zellkerne anzufärben. Die Präparate wurden lichtgeschützt für 15 min bei RT getrocknet, anschließend mit Nagellack fixiert und zeitnah unter dem Fluoreszenzmikroskop bei verschiedenen Wellenlängen untersucht.

2.10 Zellstimulation

Nach erfolgreicher Zellkultivierung wurden die Zellen mit X-VIVO™ 10 Medium ohne Zusätze gewaschen. Anschließend wurden diese 14 h mit X-VIVO™ 10 Medium ohne Zusätze kultiviert. Damit konnte die durch M-CSF hervorgerufene Aktivitätssteigerung der Zellen minimiert und die Aktivität der Zellen auf ihre Grundaktivität reduziert werden.

Im Folgenden wurde je eine Kavität mit 400 µl Medium, in denen jeweils einer der in Tabelle 7 gelisteten Stimuli enthalten waren, stimuliert. Zudem wurde eine nicht stimulierte Kontrolle angelegt und weiter in zusatzfreiem Medium kultiviert, um einen Vergleichswert zu den Stimuli zu erhalten. Die Stimulationszeiträume und Konzentrationen resultieren aus etablierten Versuchsanordnungen aus der Literatur [75, 76].

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Stimuli. Angegeben sind die Konzentration, Inkubationszeit und die Konzentration der Stocklösung.

<u>Stimulus</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Inkubationszeit</u>	<u>Konzentration der Stocklösung</u>
<i>Basal</i>		24 h	
<i>LPS von E.c. O26:B6</i>	100 ng/ml	8 h	1 mg/ml
<i>PMA in DMSO</i>	200 nM	24 h	200 µM
<i>Interferon-γ</i>	50 ng/ml	24 h	100 µg/ml

2.11 Überstand- und Zellernte

Nach Ablauf der entsprechenden Inkubationszeit wurde der Überstand abgenommen, bei 3 000 g für 20 min bei +4 °C zentrifugiert, um Schwebeteilchen zu entfernen und bei -80 °C gelagert. Sofort nach Abnahme des Überstandes von den Zellen wurde 75 µl eiskalter RIPA-Puffer mit Protease-Inhibitor (im Verhältnis 1:7) auf die Zellen gegeben, um die Zellen zu lysieren. Protease-Inhibitoren sind notwendig, um Abbauprozesse frühestmöglich zu unterbinden. Danach wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt. Nach Sonifikation der aufgenommenen Zellen für 10 s wurde bei 14 000 g für 30 min bei +4 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bei -80 °C gelagert.

2.12 MPO-ELISA

Die Quantifizierung der MPO-Produktion erfolgte mittels Sandwich-ELISA von R&D Systems aus dem Zellüberstand kultivierter Makrophagen nach Herstellerangaben. Bei dieser Methode bindet ein Analyt an einen Antikörper, der am Boden einer Mikropipettierplatte immobilisiert ist. Da dieser Antigen-Antikörper Komplex zu diesem Zeitpunkt nicht detektierbar ist, wird ein zweiter Antikörper dazugegeben, der an ein anderes Epitop des Antigens bindet, sodass ein Antikörper-Antigen-Antikörper Komplex entsteht. An den zweiten Antikörper ist dabei ein Enzym gekoppelt, das im nächsten Schritt eine chemische Reaktion katalysiert (Abbildung 8). Dazu wird ein Substrat hinzugegeben, dessen Umwandlungsprodukt in einem bestimmten Wellenlängenbereich das Licht absorbiert. Um die erhaltene Absorptionszahl in eine Konzentration umzuwandeln, bedarf es einer Standardkurve, bei der bekannte Konzentrationen einer Absorptionszahl zugeordnet werden. Um Messungenauigkeiten zu minimieren, werden jeweils Duplikate von den Standards und den Proben erstellt, um einen Mittelwert zu generieren. Insgesamt wurden sieben Standards mit einer Konzentration von 0,156 ng/ml bis 10 ng/ml und ein 0 Wert aufgetragen. Die Lagerung der Kit-Komponenten erfolgte nach Herstellerangaben bei +4 °C. Vor der Durchführung des ELISA war darauf zu achten, dass sich alle Komponenten auf RT erwärmen konnten.

Das Auflösen des Standardpulvers erfolgte mit 1,2 ml destilliertem Wasser. Dieses konnte sich bei mehrmaligem Durchmischen in einer Inkubationszeit von 15 min vollständig lösen. Um eine Standardkonzentrationsreihe anzusetzen, wurden 100 µl des aufgelösten Standardpulvers in 900 µl RD5K Lösung pipettiert und sorgfältig durchmischt, um Standard eins mit einer Konzentration von 10 ng/ml zu erhalten. Nun erfolgte eine 1:2 Verdünnung, indem 500 µl von Standard eins mit 500 µl RD5K vermischt wurden, um Standard zwei mit einer resultierenden Konzentration von 5 ng/ml zu erhalten. Das Wiederholen dieser Prozedur erfolgte insgesamt sechs Mal, um eine vollständige Standardreihe zu bilden.

Die bei -80 °C gelagerten Proben wurden aufgetaut und kurz zentrifugiert, um verbliebene Schwebstoffe zu entfernen, die Auswirkungen auf die Messung haben könnten. Das Ansetzen des Waschpuffers erfolgte im Verhältnis 1:25 mit destilliertem Wasser. Zunächst wurden 100 µl RD1-27 Verdünnungslösung in jede Vertiefung der 96-Loch Platte gegeben und mit 50 µl Probe beziehungsweise Standard ergänzt. In der folgenden Inkubationszeit konnte die MPO für 2 h an immobilisierte Antikörper am Boden der 96-Loch Platte bei RT auf einer Schüttelplatte binden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Flüssigkeit aus den Kavitäten entfernt und die Kavitäten vier Mal mit jeweils 400 µl Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden 200 µl MPO Konjugat in die leeren Kavitäten hinzugegeben und für weitere 2 h bei RT auf einer Schüttelplatte inkubiert. Dabei handelte es sich um einen zweiten Antikörper, der mit Meerrettichperoxidase gekoppelt war und ebenfalls an die

MPO band. Nach Wegschütten der ungebundenen Antikörper und erneutem viermaligem Waschen mit 400 µl Waschpuffer wurden 200 µl der Substratlösung, die aus gleichen Teilen der Farblösung A und B bestand, in die Kavitäten gegeben und für 30 min lichtgeschützt bei RT inkubiert, um eine Farbreaktion zu initiieren. Die Meerrettichperoxidase oxidierte das in der Farblösung enthaltene Tetramethylbenzidin (TMB) und rief eine Blaufärbung hervor. Um die Enzymaktivität der Meerrettichperoxidase zu stoppen und damit die Farbreaktion zu beenden, wurden 50 µl eines Stopp-Puffers in jede Kavität gegeben. Der Stopp-Puffer bestand aus Schwefelsäure, die das zuvor entstandene bläuliche Chromophor protonierte und einen Farbumschlag ins Gelbe bewirkte. Die Absorption der Proben wurde innerhalb von 30 min bei 450 nm in einem Absorptionsspektrometer der Firma Tecan gemessen. Eine zweite Messung bei einer Wellenlänge von 570 nm diente der Minimierung von Fehlern, indem die Ergebnisse von der ersten Messung bei 450 nm subtrahiert wurden. Die Standardkurven wurden mit der 4-parameter logistic Formel (4-pl Formel) ohne Gewichtung erstellt, um damit die Konzentrationen der Proben zu errechnen.

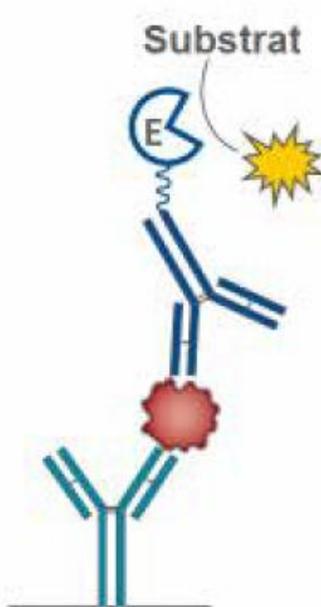


Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Sandwich ELISA. Der Primärantikörper (grün) am Boden der Mikropipettierplatte ist an das Substrat (rot) gebunden, welches ebenfalls an den Sekundärantikörper (blau) gebunden hat. An diesen Sekundärantikörper ist die Meerrettichperoxidase (E) gekoppelt, die das TMB (Substrat) oxidiert (gelbes Produkt). Quelle: Gute ELISA Praxis Handbuch, (2015), R-Biopharm AG.

2.13 Multiplex-Elisa

Um die Immunantwort der stimulierten Makrophagen zu messen, wurde ein Zytokin Multiplex ELISA verwendet. Im Gegensatz zum klassischen ELISA, bei dem lediglich ein Analyt gemessen werden kann, liegt der Vorteil eines Multiplex ELISA in der gleichzeitigen Messung von mehreren Analyten. Das hier verwendete 25-Plex Panel maß dabei 25 Analyte gleichzeitig. Prinzipiell liegt der Methode ein detektierbarer Antikörper-Antigen-Antikörper Komplex, vergleichbar der eines Sandwich ELISAs, zugrunde. Jedem zu messenden Analyten ist ein farbcodiertes, magnetisches Partikel zugeordnet, das über einen Antikörper an den Analyten bindet. Anschließend wird ein Detektorantikörper addiert, der an ein anderes Epitop des Analyten bindet. An diesen Detektorantikörper kann sich nun der Fluoreszenzfarbstoff R-Phycoerythrin (RPE) über eine Streptavidinbindung anlagern (Abbildung 9).

Mit Hilfe der xMAP® Technologie können die Floreszenzen in einer Durchflusszytometrie quantifiziert werden. Dabei werden die einzelnen magnetischen Partikel durch ihre Farbcodierung identifiziert und gezählt. Diese Fluoreszenzmessung wird mehrmals wiederholt und der Median der einzelnen Messungen ermittelt (MFI-Wert). Über eine Standardkurve lässt sich die Konzentration der Analyten in einer Probe errechnen. Die Standardkurve wurde mit Hilfe der 5-pl Formel mit einer $1/y^2$ Gewichtung durch die Punkte der jeweils sieben Doppelbestimmungen des Standards gelegt. Die Standards hatten dabei eine 1:3 Verdünnung. Eine nachträgliche Anpassung der Kurven war bei stark voneinander abweichenden Doppelbestimmungswerten unabdingbar, um Fehler zu minimieren. Zur Qualitätssicherung wurden in einem zweiten Schritt der Analyse die Daten der unmodifizierten Standardkurven mit den Daten der überarbeiteten Standardkurven verglichen.

Die Standardkurven wurden durch eine serielle 1:3 Verdünnung aus X-VIVO™ 10 Medium und Verdünnungslösung im Verhältnis 1:1 generiert. Dabei hatten die 25 Analyten unterschiedliche Stockkonzentrationen. Ein Leer-Wert bestehend aus X-VIVO™ 10 Medium und Verdünnungslösung im Verhältnis 1:1 wurde ebenfalls mitgeführt.

Die antikörpermarkierten Partikel wurden für 30 s gevortext und 30 s im Wasserbad sonifiziert, um eine homogene Verteilung sicherzustellen. Je 25 µl dieser Lösung wurde pro Vertiefung in die 96-Loch Platte gegeben und die darin enthaltenen antikörpermarkierten Partikel konnten dort für 60 s durch den Magneten am Boden der Mikropipettierplatte adhären. Diese magnetische Fixierung der Partikel musste bei jedem Waschschrift berücksichtigt werden, da die Partikel nicht immobilisiert waren wie bei einem herkömmlichen ELISA und beim Waschen verloren gegangen wären. Bei jedem Pipettierschritt wurde die Platte auf dem Magneten verankert. Nach zweimaligem Waschen mit jeweils 200 µl Waschpuffer wurde 50 µl Inkubationspuffer in jede Vertiefung der 96-Loch Platte gegeben. 100 µl des Standards bzw. des Leerwerts wurden in die entsprechenden Kavitäten dazugegeben. Die anderen Kavitäten wurden mit 50 µl der zentrifugierten Proben im Verhältnis 1:1 mit Verdünnungslösung befüllt. Nun konnten die antikörpermarkierten magnetischen Partikel lichtgeschützt an die Analyten in der zweistündigen Inkubationszeit bei RT auf einer Schüttelplatte binden. Nach dem Verwerfen der Flüssigkeit und zweimaligem Waschen mit jeweils 200 µl Waschpuffer erfolgte die Hinzugabe von jeweils 100 µl biotinyliertem Detektorantikörper, der in einer 1:10 Verdünnung vorlag. Um die Bindung des Detektorantikörpers an den Analyten sicher zu stellen, wurde für 1 h lichtgeschützt bei RT auf einer Schüttelplatte inkubiert. Die Flüssigkeit wurde anschließend entfernt und zwei Mal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden jeweils 100 µl Streptavidin-RPE in einer 1:10 Verdünnung pro Kavität hinzugefügt. Das fluoreszierende RPE band dabei über eine Streptavidin-Biotin Bindung in einer 30-minütigen, lichtgeschützten Inkubationszeit bei RT an den Komplex. Nach der Inkubationszeit und Verwerfen der Flüssigkeit wurde drei Mal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen. Im letzten Schritt wurden die entstandenen Komplexe in 150 µl Waschpuffer resuspendiert, um sie in einem

Luminex® 100 zu messen. Vor der Messung wurde die Platte im Gerät für 3 min geschüttelt, um eine gleichmäßige Verteilung der Komplexe in der Suspension zu ermöglichen. Dieses Gerät benutzt die bereits beschriebene xMAP® Technologie zur Quantifizierung der Analyten.

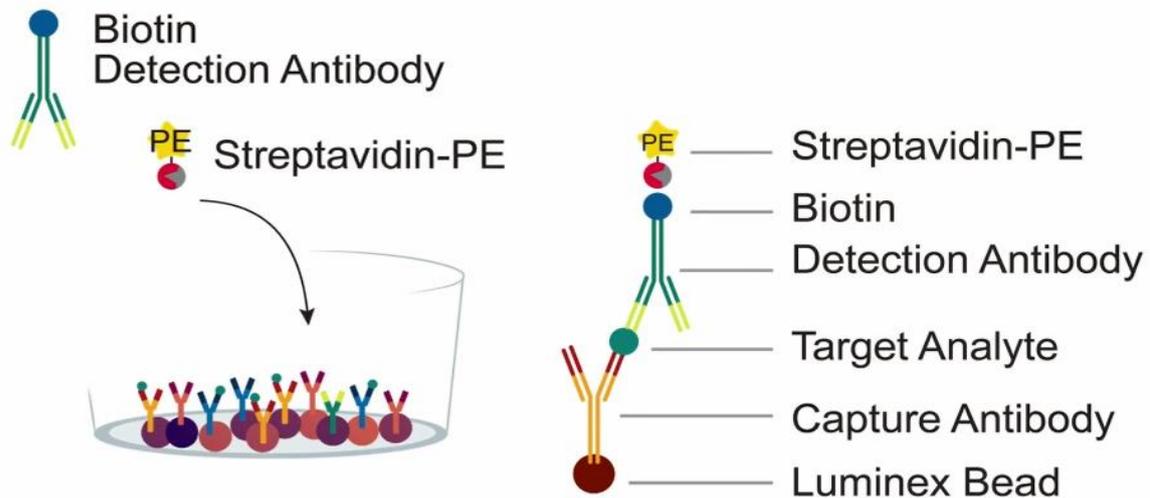


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Antikörper-Antigen-Antikörperkomplexes. Quelle: R&D Systems: Luminex® Assays, (2016), The scientist creative services division.

2.14 Indirekte Quantifizierung der kultivierten Makrophagen durch die Proteinbestimmung nach Lowry

Um die gemessenen Konzentrationswerte der Zytokine und der MPO im Überstand zu standardisieren, wurde die Proteinkonzentration der lysierten Zellen jeder Kavität gemessen, da sich die Zelldichten unterschieden. Dabei fand eine modifizierte Proteinbestimmung nach Lowry in einer 96-Loch Mikropipettierplatte Verwendung, bei der die Proteinkonzentration mit Hilfe der Absorptionzahl der Flüssigkeit gemessen wird [77]. Die Standardkurve entsprach einer linearen Funktion, da sich Konzentration und Absorption proportional zueinander verhalten.

2.15 Statistische Auswertung und verwendete Programme

Die Daten wurden mit der Software SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) Version 23 von IBM statistisch ausgewertet. Die Ergebnisse der Genotypisierung wurden mit „Software 7500“ von Applied Biosystems® ausgewertet. Die Standardkurven des Multiplex ELISA wurden mit der zum Gerät passenden „xPONENT®“ Software von Luminex® ausgewertet und bearbeitet. Die Standardkurven zur Proteinbestimmung und des MPO ELISA wurden mit der „MyAssays Desktop“ Software von MyAssays erstellt.

Die Daten wurden mit ihren Mittelwerten und Standardabweichungen bei normalverteilten Parametern und mit Median und Interquartilenabstand bei nicht normalverteilten Parametern angegeben. Der Interquartilenabstand ist als Differenz von der 75. Perzentile mit der 25. Perzentile definiert. Diese Werte geben Informationen über die Streuung der Werte. Bei kategorischen Parametern wurden Kontingenztabelle angelegt und die Ergebnisse mittels Chi-Quadrat-Test ermittelt. Wenn die Fallzahl in einer Gruppe fünf unterschritt, wurde auf den exakten Test nach Fisher zurückgegriffen. Um einen besseren Überblick auf den Einfluss des Genotyps auf die Mediane bzw. Mittelwerte der einzelnen Parameter zu bekommen, wurden diese ebenfalls nach den Genotypen stratifiziert aufgelistet. Zum Vergleich der Mittelwerte der einzelnen Parameter in den verschiedenen Genotypisierungsgruppen wurde eine ANOVA bei normalverteilten Parametern und der Kruskal-Wallis-Test bei nicht normalverteilten Parametern angewandt. Die Freiheitsgrade, der F-Wert und die Signifikanz der ANOVA wurden tabellarisch dargestellt und der „least significant difference test“ (LSD-Test) sowie Bonferroni als Post-Hoc-Test verwendet. Beim Kruskal-Wallis-Test wurden die Fallzahl, der mittlere Rang und die Signifikanz angegeben. Bei signifikanten Werten im Kruskal-Wallis-Test wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet, um die genauen Unterschiede zwischen den Genotypen zu bestimmen. Bei beiden Tests wurde jeweils die exakte zweiseitige Signifikanz berücksichtigt. Mit Hilfe des exakten Tests nach Fisher wurden Zusammenhänge zwischen dem Polymorphismus und Folgeerkrankungen herausgearbeitet. Signifikante oder auffällige Werte wurden dabei in der Tabelle hervorgehoben und zum Teil graphisch dargestellt. Das Signifikanzniveau entspricht dabei der zweiseitigen exakten Signifikanz. Als Ausreißer wurde ein Wert definiert, der die 75. Perzentile um das 1,5-fache des IQR überstieg. Die Allelfrequenz des Polymorphismus wurde mittels Hardy-Weinberg-Equilibrium determiniert und mit dem Chi-Quadrat-Test ausgewertet. Die wichtigsten Ergebnisse wurden in Streu-, Balken- und Kreisdiagrammen visualisiert. Der p-Wert wurde auf ein Signifikanzniveau von $< 0,05$ festgelegt.

Zur Untersuchung des Effekts des Polymorphismus auf die Folgeerkrankungen des Diabetes Mellitus wurde auch auf ein dominantes und rezessives Modell zurückgegriffen. Beim dominanten Modell wurde davon ausgegangen, dass die Anwesenheit eines veränderten Genabschnitts ausreicht, um einen klinischen oder messbaren Effekt zu erzeugen. Daher wurden hier die heterozygote und homozygote Gruppe zusammengefasst und zusammen gegen die Wildtypgruppe verglichen. Im rezessiven Modell verhielt es sich genau umgekehrt. Hier lag die Annahme darin, dass lediglich eine Veränderung beider Gene zu einem klinisch messbaren Effekt führten. Dazu wurden die heterozygote und die Wildtypgruppe zusammengefasst und mit der homozygoten Gruppe verglichen.

2.16 Labor- und Vitalparameter

In dieser Arbeit werden verschiedene Labor- und Vitalparameter der Probanden erfasst, die in Tabelle 8 kurz erklärt und deren klinische Bedeutung erörtert wird [28, 78].

Tabelle 8: Erklärung der erhobenen Laborparameter.

<u>Parameter</u>	<u>Beschreibung</u>
<i>BMI</i>	Rechnerisch bestimmter Index, der die Relation zwischen der Körpergröße und dem Körpergewicht beschreibt
<i>RR SYS</i>	Blutdruck, der durch die systolische Myokardkontraktion erzeugt wird
<i>RR DYS</i>	Blutdruck, der während der Diastole im arteriellen System besteht
<i>HbA1c</i>	Anteil des nicht-enzymatisch-glykosylierten Hämoglobins (Glykohämoglobin) am Gesamthämoglobin; Parameter gibt Auskunft über den durchschnittlichen Blutzucker der letzten acht Wochen
<i>Plasma-Glukose</i>	Glukosekonzentration im Blutplasma
<i>Gesamt-Cholesterin</i>	Gesamtkonzentration aller Cholesterine im Blut
<i>Triglyzeride</i>	Fettsäuren
<i>HDL</i>	Lipoproteine, die in der Leber und im Darm synthetisiert werden und dem Rücktransport des Cholesterins aus der Peripherie zur Leber dienen
<i>LDL</i>	Cholesterinreiche Lipoproteine, die beim hepatischen Metabolismus von VLDL entstehen und dem Transport von Cholesterin aus der Leber in die Peripherie dienen
<i>GFR</i>	Volumen, das pro Zeiteinheit von den Glomeruli der Niere aus dem Blut filtriert wird; Parameter dient zur Beurteilung der Nierenfunktion
<i>Kreatinin</i>	Harnpflichtiger Metabolit des Kreatins (Energieträger der Muskulatur), der ein Parameter für die Nierenfunktion darstellt
<i>Harnsäure</i>	Harnpflichtiger Metabolit der Purinbase, der ein Parameter für die Nierenfunktion und die orale Purinaufnahme ist
<i>Neutrophile Granulozyten</i>	Untergruppe der Leukozyten, die zum unspezifischen Immunsystem gehören; Primäre Aufgabe ist die Erstabwehr gegen Bakterien durch Phagozytose und Exozytose bakterizider Stoffe aus Granula
<i>Lymphozyten</i>	Untergruppe der Leukozyten; die Lymphozyten können in B- und T-Lymphozyten unterschieden werden, die sehr vielfältige Aufgaben erfüllen
<i>Monozyten</i>	Untergruppe der Leukozyten; bilden die Vorstufe verschiedener Immunzellen, beispielsweise der Makrophagen
<i>Eosinophile Granulozyten</i>	Untergruppe der Leukozyten; gehören zum unspezifischen Immunsystem; ihre primäre Aufgabe besteht in der Abwehr von Parasiten; sie spielen allerdings auch eine tragende Rolle in der Pathophysiologie von allergischen Reaktionen
<i>Basophile Granulozyten</i>	Untergruppe der Leukozyten und gehören zum unspezifischen Immunsystem; sie erfüllen ähnliche Funktionen wie die eosinophilen Granulozyten
<i>GPT</i>	Synonym: Alanin-Aminotransferase (ALAT); Enzym, das besonders im Zytosol von Hepatozyten und Muskelzellen vorkommt und als Parameter für verschiedene Lebererkrankungen dient
<i>GOT</i>	Synonym: Aspartat-Aminotransferase (ASAT); Enzym, das besonders in den Mitochondrien von Hepatozyten und der Muskulatur vorkommt und als Parameter für das Ausmaß für den

	Zelluntergang von Hepatozyten und eingeschränkt für den Zelluntergang von Muskelzellen dient
γ -GT	Membranständiges Enzym, das vor allem in der Leber, aber auch in anderen Organen zu finden ist; die wichtigste Aufgabe des γ -GT besteht im Transfer von Aminosäuren nach intrazellulär
CRP	Hepatisch synthetisiertes Plasmaprotein, das zu den Akut-Phase-Proteinen gehört; es aktiviert sowohl das humorale als auch das zelluläre Immunsystem
BKS	Unspezifischer Parameter für den Nachweis und Aktivitätsbestimmung von entzündlichen Erkrankungen; der Parameter wird aber auch durch viele nicht-entzündliche Erkrankungen beeinflusst

2.17 Zytokine

Die wichtigsten Eigenschaften, der in dieser Studie gemessenen Zytokine, werden in Tabelle 9 beschrieben [79, 80].

Tabelle 9: Übersicht über die gemessenen Zytokine.

<u>Zytokin</u>	<u>Beschreibung</u>
<i>GM-CSF</i>	Induktion der Differenzierung von Makrophagen, dendritischen Zellen und Granulozyten
<i>IL-1 RA</i>	Kompetitive Hemmung von IL-1 zur Regulation einer überschießenden Immunantwort
<i>IL-1 β</i>	Pyrogen; Aktivierung von T-Lymphozyten und Makrophagen
<i>IL-2 R</i>	Synonym: CD 25; wird von aktivierten Lymphozyten sezerniert und zeigt bei aktiven Tumorerkrankungen erhöhte Spiegel
<i>IL-2</i>	Aktivierung von T-Lymphozyten
<i>IL-6</i>	Pyrogen; Aktivierung und Differenzierung von Lymphozyten; akute Phase Protein
<i>IL-7</i>	Induktion der Synthese von Lymphozyten
<i>IL-8</i>	Aktivierung von neutrophilen Granulozyten
<i>IL-10</i>	Anti-inflammatorisches Interleukin mit komplexen Wirkmechanismen
<i>IL-12</i>	Aktivierung von NK-Zellen und Induktion der Differenzierung von CD 4 ⁺ -Zellen zu TH1-Zellen
<i>IL-15</i>	Aktivierung von T-Lymphozyten und NK-Zellen
<i>Interferon-α</i>	Sehr heterogene Gruppe aus > 12 Subtypen, deren Synthese durch doppelsträngige-RNA stimuliert wird (bei viralen Erkrankungen) und die Virenreplikation in der Wirtszelle hemmt; zudem Aktivierung von NK-Zellen und Expressionserhöhung von MHC-Klasse I Molekülen
<i>Interferon-γ</i>	Induktion der Produktion von MHC-Molekülen, Aktivierung von Makrophagen
<i>MCPI</i>	monocyte chemoattractant protein 1; Synonym: CCL2; chemotaktische Wirkung auf Monozyten, basophile und eosinophile Granulozyten und löst deren Degranulation aus
<i>MIG1</i>	Monokine-induced by IFN- γ ; Sezernierung aus Makrophagen nach Stimulation mit Interferon γ ; Aktivierung von T-Lymphozyten
<i>MIP1 α</i>	Macrophage inflammatory protein 1 α ; Synonym: CCL3; pyrogen; Sezernierung nach Stimulation von u. a. Makrophagen mit bakteriellen Endotoxinen und Aktivierung von Granulozyten
<i>MIP1 β</i>	Macrophage inflammatory protein 1 β ; Synonym: CCL4; spielt eine tragende Rolle in der Bekämpfung des HI-Virus
<i>Rantes</i>	regulated on activation, normal T cell expressed and secreted; Synonym: CCL 5; Aktivierung von NK-Zellen und Makrophagen durch Sezernierung aus CD 28 und CD 8 Zellen sowie aus neutrophilen Granulozyten
<i>TNF α</i>	Tumor Nekrosefaktor α ; lokaler Entzündungsmediator mit vielen endogenen Funktionen

2.18 Chemikalien

Tabelle 10: Übersicht über die verwendeten Chemikalien und deren Hersteller.

<u>Chemikalien</u>	<u>Hersteller</u>
<i>2x TaqMan® GTXpress™ Master Mix</i>	Applied Biosystems GmbH, Darmstadt, DE
<i>40x SNP Assay Working Stock solution, rs5918</i>	Applied Biosystems GmbH, Darmstadt, DE
<i>Bovine Serum Albumin (BSA)</i>	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
<i>CD 14 MicroBeads, human</i>	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, DE
<i>cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail</i>	Roche GmbH, Mannheim, DE
<i>DAKO Fluorescence Mounting Medium</i>	DAKO, Santa Clara, USA
<i>DAPI</i>	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
<i>Dil-oxLDL</i>	Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
<i>Dil-oxLDL, BT-920</i>	Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
<i>DMEM-Medium</i>	Gibco, Karlsruhe, DE
<i>DMSO</i>	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
<i>EDTA</i>	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
<i>Ethanol</i>	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
<i>FCS, heat inactivated FCS</i>	Gibco, Karlsruhe, DE
<i>Human Serum off the clot Typ AB</i>	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, DE Capricorne Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, DE
<i>Interferon-γ</i>	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
<i>LPS; Escherichia coli O26:B6</i>	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
<i>M-CSF</i>	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, DE
<i>Natriumhydroxid</i>	ROTH GmbH, Karlsruhe, DE
<i>PBS</i>	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
<i>PMA</i>	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
<i>RIPA-Puffer</i>	Cell Signaling Technology, Leiden, NLD
<i>Roti-Histofix 4 %</i>	Roth GmbH, Karlsruhe, DE
<i>RPMI 1640 Medium</i>	Gibco, Karlsruhe, DE
<i>Trypanblau</i>	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
<i>X-VIVO™ 10 Medium</i>	Lonza GmbH, Köln, DE

2.19 Geräte

Tabelle 11: Übersicht über verwendete Geräte und deren Hersteller.

<u>Gerät</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Absorptionsspektrometer	Sunrise	Tecan, Zürich, CH
Analysewaage	Analysewaage	Sartorius AG, Göttingen, DE
Floureszenzmikroskop	DM5000B	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE
Heizschüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Inkubator	HERA cell 240	Heraeus Holding GmbH, Hanau, DE
Kühlschrank	Ultra low temperatur freezer, MDF-U700VX-PE	Panasonic GmbH, Hamburg, DE
Lichtmikroskop	DMIL LED	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE
Luminex 100	CS 1000 Autoplex Analyzer	Perkin Elmer, Massachusetts, USA
Mikroskopkamera	MC120 HD	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE
PCR-Gerät	7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems GmbH, Darmstadt, DE
pH-Meter	Orion Star A111 pHMeter	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Schüttelmaschine	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, INC, USA
Sonifikationsstab	Sonifier B-12	Branson Emerson Sonic Power Company, Dietzenbach-Steinberg, DE
Spektrometer	NanoDrop Spectrophotometer ND-1000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE
Sterile Werkbank	Hera Safe	Heraeus Holding GmbH, Hanau, DE
Vakuumpumpe	Vacusaft comfort	IBS Integra Biosciences AG, Zizers, CH
Vortexer	Lab dancer S40	VWR, Radnor, USA
Wasserbad	1083	GFL, Burgwedel, DE
Zellzählgerät	Luna Automated Cell Counter	Logos Biosystems, Annandale, USA
Zentrifuge	5417R	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Zentrifuge	Laboratory Centrifuges 4-15c	SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, DE
Zentrifuge	Varifuge 3.0RS	Heraeus Instruments Holding GmbH, Hanau, DE

2.20 Kits & ELISAs

Tabelle 12: Übersicht über verwendete Kits und deren Hersteller.

<u>Kit</u>	<u>Hersteller</u>
DC Protein Assay	Bio Rad, Californian, USA
Human Cytokine Magnetic 25-Plex Panel	Novex, Maryland, USA
QIAamp® DNA Blood Mini Kit	QIAGEN®, Hilden, DE
Quantikine® ELISA human Myeloperoxidase	R&D Systems, Wiesbaden, DE
Whole Blood column Kit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, DE

3. Ergebnisteil

3.1 Statistische Auswertung der anthropometrischen Daten und der Laborparameter

Insgesamt beinhaltet diese Studie 193 Patienten, von denen 7 Patienten nachträglich ausgeschlossen werden, da eine Blutentnahme der Patienten nicht möglich war. Im Gesamtkollektiv hat der Polymorphismus eine homozygote Häufigkeit von 3,23 % und eine heterozygote relative Häufigkeit von 26,34 %. 70,43 % der eingeschlossenen Patienten tragen den Polymorphismus nicht (Abbildung 10). Die Allelfrequenz des Wildtyps beträgt $p = 0,84$ und die des Polymorphismus $q = 0,16$. Das Ergebnis des Chi-Quadrat-Test zeigt einen nicht signifikanten Wert ($p = 0,59$) mit einem $\chi^2 = 0,29$. Mit Hilfe des Hardy-Weinberg-Equilibrium [81] ist damit ersichtlich, dass die Allele unabhängig voneinander vererbt werden (Tabelle 13).

Tabelle 13: Hardy-Weinberg-Equilibrium. Dargestellt sind die erwarteten und beobachteten absoluten Häufigkeiten der Genotypen.

<u>Genotyp</u>	<u>Beobachtet</u>	<u>Erwartet</u>
Wildtyp	131	130
Heterozygot	49	51
Polymorphismus	6	5

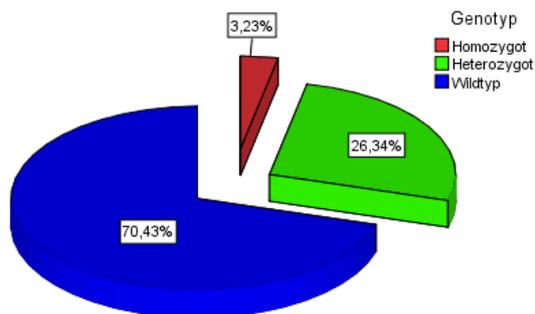


Abbildung 10: Darstellung der relativen Häufigkeiten der drei Genotypen in einem Kuchendiagramm.

Tabelle 14 zeigt alle erhobenen Laborparameter der Gesamtkohorte ohne Berücksichtigung des Genotyps. Der Altersdurchschnitt liegt bei 64 Jahren. Insgesamt beinhaltet das Kollektiv 116 Männer (62,4 %) und 70 Frauen (37,6 %). Der durchschnittliche Blutdruck liegt im hoch-normalen Bereich (138 [24] / 80 [14] mmHg) und die durchschnittliche GFR beträgt $75,34 \text{ ml} \pm 21,87$. Alle sonstigen Werte liegen im zu erwartenden Normbereich. Die zum Teil schwankenden Fallzahlen sind darauf zurückzuführen, dass nicht alle in dieser Studie berücksichtigten Parameter durch den behandelnden Arzt bestimmt wurden und damit aus den Akten nicht zu entnehmen waren.

Tabelle 14: Übersicht über die normalverteilten und nichtnormalverteilten Parameter in der Gesamtkohorte. Parameter sind mit der Fallzahl (N), dem Mittelwert und der Standardabweichung (SD) bzw. dem Median und dem Interquartilenabstand (IQR) angegeben.

<u>Normalverteilte Parameter</u>		
<u>Parameter</u>	<u>N</u>	<u>Mittelwert mit SD</u>
Gesamtcholesterin [mg/dl]	173	192,32 ± 38,19
GFR [ml/min]	156	75,34 ± 21,87
LDL [mg/dl]	160	120,06 ± 33,88
Lymphozyten [%]	67	28,09 ± 7,57
Neutrophile Granulozyten [%]	67	61,08 ± 8,14
<u>Nichtnormalverteilte Parameter</u>		
<u>Parameter</u>	<u>N</u>	<u>Median mit IQR</u>
Alter	186	64 (17)
Körpergröße [cm]	183	170 (14)
Gewicht [kg]	182	87,65 (20)
BMI	182	29,73 (6)
RR SYS [mmHg]	177	138 (24)
RR DYS [mmHg]	177	80 (14)
HbA1c [%]	186	7 (2)
Plasmaglukose [mg/dl]	74	152,5 (66)
Triglyzeride [mg/dl]	158	167,5 (118)
HDL [mg/dl]	162	46,55 (20)
Kreatinin [mg/dl]	175	0,99 (0)
Harnsäure [mg/dl]	162	5,85 (2)
Eosinophile Granulozyten [%]	67	2,1 (2)
Basophile Granulozyten [%]	67	0,4 (0)
Monozyten [%]	67	7,9 (2)
Sonstige Leukozyten [%]	60	0 (0)
GPT [U/l]	105	27 (18)
GOT [U/l]	49	26 (13)
γ-GT [U/l]	143	33 (30)
CRP [mg/l]	75	0,46 (2)
BKS [mm/h]	19	9 (14)

Es zeigt sich, dass der Genotyp geschlechtsunabhängig vorkommt (Tabelle 15).

Tabelle 15: Geschlechterverhältnis stratifiziert für den Genotyp.

		<i>Genotyp</i>			<u>Gesamt</u>	
		Wildtyp	Heterozygot	Homozygot		
<i>Geschlecht</i>	Weiblich	Anzahl	50	18	2	70
		Gesamtzahl [%]	26,9	9,7	1,1	37,6
	Männlich	Anzahl	81	31	4	116
		Gesamtzahl [%]		16,7	2,2	62,4
<i>Gesamt</i>	Anzahl	131	49	6	186	
	Gesamtzahl [%]	70,4	26,3	3,2	100	

In Tabelle 16 ist eine deskriptive Analyse der erhobenen Laborparameter für den jeweiligen Genotyp aufgeführt.

Tabelle 16: Übersicht über die normalverteilten und nichtnormalverteilten Parameter, stratifiziert für den Genotyp. Parameter sind mit dem Mittelwert und der SD bzw. dem Median und dem Interquartilenabstand (IQR) angegeben. Die Maßeinheiten stehen in eckigen Klammern hinter den jeweiligen Parametern. Der IQR ist auf ganze Zahlen gerundet. * Parameter nicht erhoben.

<u>Parameter</u>	<u>Genotyp</u>		
	Wildtyp	Heterozygot	Homozygot
	<u>Normalverteilte Parameter</u>		
	<u>Mittelwert ± SD</u>	<u>Mittelwert ± SD</u>	<u>Mittelwert ± SD</u>
<i>Gesamtcholesterin [mg/dl]</i>	193,13 ± 41	191,60 ± 31	181,83 ± 35
<i>LDL [mg/dl]</i>	119,75 ± 35	122,59 ± 31	107 ± 29
<i>GFR [ml/min]</i>	73,43 ± 21	81,73 ± 22	62,33 ± 25
<i>Neutrophile Granulozyten [%]</i>	60,04 ± 8,1	64,87 ± 7,9	58,65 ± 2,1
<i>Lymphozyten [%]</i>	28,80 ± 7,8	25,87 ± 6,7	26,95 ± 7,3

	<u>Nichtnormalverteilte Parameter</u>		
	<u>Median (IQR)</u>	<u>Median (IQR)</u>	<u>Median (IQR)</u>
<i>Alter</i>	65 (18)	62 (16)	69,5 (40)
<i>Körpergröße [cm]</i>	170 (14)	169,5 (15)	171 (12)
<i>Gewicht [kg]</i>	87,36 (20)	89 (18)	92,05 (14)
<i>BMI</i>	29,54 (6)	30,06 (7)	30,21 (11)
<i>RR SYS [mmHg]</i>	138 (26)	139 (18)	133 (43)
<i>RR DYS [mmHg]</i>	80 (18)	80 (4)	82 (18)
<i>HbA1c [%]</i>	7 (2)	7,2 (2)	7,5 (2)
<i>Plasmaglukose [mg/dl]</i>	153 (55)	129,5 (81)	157 (172)
<i>Triglyzeride [mg/dl]</i>	175 (114)	167 (149)	117,5 (59)
<i>HDL [mg/dl]</i>	46,7 (21)	46,2 (12)	46,8 (32)
<i>Kreatinin [mg/dl]</i>	0,97 (0)	1 (0)	1,32 (0)
<i>Harnsäure [mg/dl]</i>	5,9 (2)	5,7 (2)	8,3 (4)
<i>Eosinophile Granulozyten [%]</i>	2,15 (2)	1,9 (2)	2,15 (0)
<i>Basophile Granulozyten [%]</i>	0,4 (0)	0,3 (0)	0,55 (0)
<i>Monozyten [%]</i>	7,95 (2)	7,2 (3)	11,7 (7)
<i>Sonstige Leukozyten [%]</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>GPT [U/l]</i>	26,5 (18)	28 (18)	18,5 (9)
<i>GOT [U/l]</i>	26,5 (13)	26 (15)	*
<i>γ-GT [U/l]</i>	35 (31)	27 (28)	32 (49)
<i>CRP [mg/l]</i>	0,95 (3)	0,28 (2)	0,41 (0)
<i>BKS [mm/h]</i>	9 (12)	9 (31)	*

Abhängig von der Verteilung wird mit zwei verschiedenen statistischen Testverfahren eine mögliche Assoziation der untersuchten Parameter mit dem Genotyp untersucht (Appendix I; Tabelle I und II). Bezüglich der Laborparameter gibt es zwischen den Genotypen demnach signifikante Unterschiede bei der GFR ($p = 0,034$). Dabei liegt der größte Unterschied zwischen den Mittelwerten der heterozygoten (81,73 ml/min \pm 22) und der homozygoten Gruppe (62,33 ml/min \pm 25). Ferner zeigt sich ein signifikanter Unterschied bei der γ -GT ($p = 0,027$). Hier liegt der größte Unterschied zwischen den Medianen der Wildtypgruppe [35 U/l (31)] und der heterozygoten Gruppe [27 U/l (28)]. Außerdem gibt

es einen trendhaften Unterschied ($p = 0,112$) bei den Medianen der Kreatininwerte zwischen der Wildtypgruppe [0,97 mg/dl (0)] und der homozygoten Gruppe [1,32 mg/dl (0)].

Um die Effekte des untersuchten Polymorphismus auf die Kreatininwerte und die γ -GT zu verdeutlichen, wird auf dominante und rezessive Modelle zurückgegriffen. Die Rationale dahinter begründet sich in der Möglichkeit der genaueren Betrachtung eines Effekts durch den Polymorphismus, der durch bestimmte genetische Konstellationen verstärkt wird. Hintergrund ist dabei, dass im dominanten Modell die Veränderung eines Gens bereits Auswirkungen zeigt, wohingegen im rezessiven Modell beide Gene verändert sein müssen, um eine messbare Änderung zum Wildtyp zu zeigen. Dabei zeigt sich bei der γ -GT im dominanten Modell ein signifikanter Unterschied ($p = 0,009$) zwischen dem mindestens heterozygot vorliegendem Polymorphismus [27 U/l (28)] und der Wildtyp-Gruppe [35 U/l (31)] (Abbildung 11). Bei den Kreatininwerten zeigt sich im rezessiven Modell ein signifikanter Unterschied ($p = 0,029$) zwischen den für den untersuchten Polymorphismus homozygoten Patienten [1,32 mg/dl (0,56)] und der Vergleichsgruppe, bestehend aus heterozygoten Patienten und den Wildtyppatienten [0,97 mg/dl (0,33)] (Abbildung 12). Diese Auffälligkeit korrespondiert mit den signifikanten Unterschieden bei der GFR zwischen den verschiedenen Gruppen (Appendix I; Tabelle I).

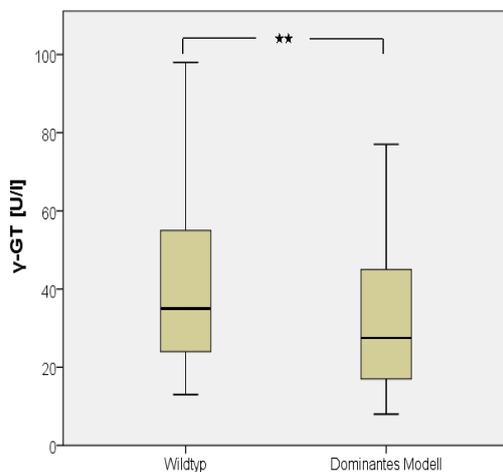


Abbildung 11: Auswirkungen des Genotyps im dominanten Modell auf die γ -GT im Boxplot dargestellt. Zwei Sterne geben ein Signifikanzniveau von $p < 0,01$ an.

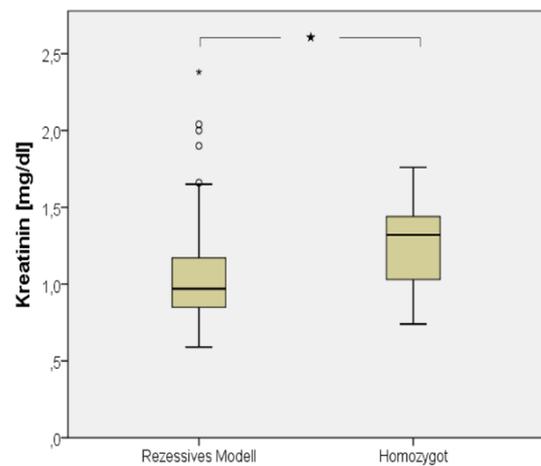


Abbildung 12: Auswirkungen des Genotyps im rezessiven Modell auf das Kreatinin im Boxplot dargestellt. Ein Stern gibt ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ an.

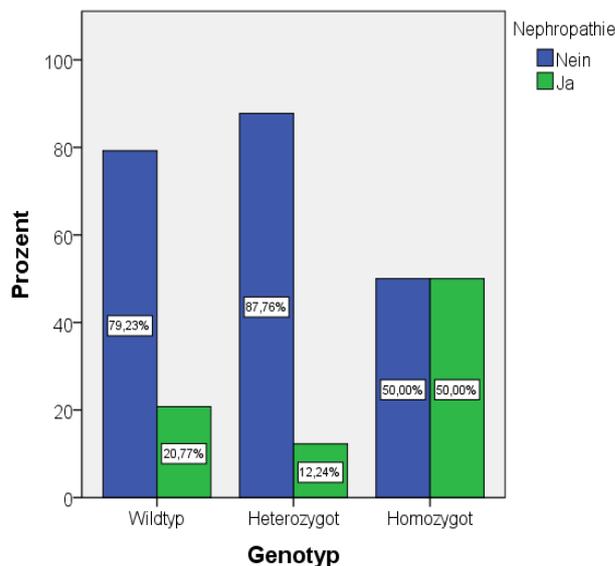


Abbildung 13: Relative Häufigkeit (x-Achse) einer Nephropathie relativ zu den Genotypen. Genaue Prozentangaben sind in den Balken zu finden. Die blauen Balken zeigen den Prozentsatz an Probanden, die nicht an einer Nephropathie erkrankt sind, die grünen symbolisieren die erkrankten Probanden.

Das Ergebnis der Untersuchung des Einflusses des Polymorphismus auf assoziierte Folgeerkrankungen eines Diabetes Mellitus ist in Tabelle 17 aufgeführt. 50 % der homozygoten Patienten leiden an einer Nephropathie, jedoch nur 20,77 % der Wildtyppatienten (Abbildung 13).

Tabelle 17: Übersicht über die Verteilung von Diabetes Mellitus assoziierter Erkrankungen innerhalb der Genotypen. Absolute Anzahl sowie relative Häufigkeit bezogen auf das Gesamtkollektiv sind angegeben. Wichtige Zahlen, auf die im Text näher eingegangen wird, sind markiert.

		<u>Genotyp</u>			<u>Gesamt</u>	
		Wildtyp	Heterozygot	Homozygot		
paVK	Keine pAVK	Anzahl	115	44	5	164
		Gesamtzahl [%]	62,80	24,00	2,70	89,60
	Grad 1	Anzahl	1	0	0	1
		Gesamtzahl [%]	0,50	0,00	0,00	0,50
	Grad 2a	Anzahl	5	2	0	7
		Gesamtzahl [%]	2,70	1,10	0,00	3,80
	Grad 2b	Anzahl	7	2	0	9
		Gesamtzahl [%]	3,80	1,10	0,00	4,90
	Grad 3	Anzahl	0	0	1	1
		Gesamtzahl [%]	0,00	0,00	0,50	0,50
	Grad 4	Anzahl	0	1	0	1
		Gesamtzahl [%]	0,00	0,50	0,00	0,50

		Anzahl	128	49	6	183
	<i>Gesamt</i>	Gesamtzahl [%]	69,90	26,80	3,30	100,00
<i>KHK</i>	<i>Keine</i>	Anzahl	98	40	3	141
		Gesamtzahl [%]	53,00 %	21,60 %	1,60 %	76,20 %
	<i>Grad 1</i>	Anzahl	8	3	1	12
		Gesamtzahl [%]	4,30 %	1,60 %	0,50 %	6,50 %
	<i>Grad 2</i>	Anzahl	12	3	2	17
		Gesamtzahl [%]	6,50 %	1,60 %	1,10 %	9,20 %
	<i>Grad 3</i>	Anzahl	12	3	0	15
		Gesamtzahl [%]	6,50 %	1,60 %	0,00 %	8,10 %
		<i>Gesamt</i>	Anzahl	130	49	6
		Gesamtzahl [%]	70,30 %	26,50 %	3,20 %	100,00 %
<i>KHK Bypass</i>	<i>Nein</i>	Anzahl	117	45	6	168
		Gesamtzahl [%]	63,60 %	24,50 %	3,30 %	91,30 %
	<i>Ja</i>	Anzahl	12	4	0	16
		Gesamtzahl [%]	6,50 %	2,10 %	0,00 %	8,60 %
		<i>Gesamt</i>	Anzahl	129	49	6
		Gesamtzahl [%]	70,10 %	26,60 %	3,30 %	100,00 %
<i>Herzinfarkt</i>	<i>Nein</i>	Anzahl	115	45	5	165
		Gesamtzahl [%]	62,20 %	24,30 %	2,70 %	89,20 %
	<i>Ja</i>	Anzahl	15	4	1	20
		Gesamtzahl [%]	8,10 %	2,20 %	0,50 %	10,80 %
		<i>Gesamt</i>	Anzahl	130	49	6
		Gesamtzahl [%]	70,30 %	26,50 %	3,20 %	100,00 %
<i>Insult</i>	<i>Nein</i>	Anzahl	122	47	6	175
		Gesamtzahl [%]	65,90 %	25,40 %	3,20 %	94,60 %
	<i>Ja</i>	Anzahl	8	2	0	10
		Gesamtzahl [%]	4,30 %	1,10 %	0,00 %	5,40 %
		<i>Gesamt</i>	Anzahl	130	49	6
		Gesamtzahl [%]	70,30 %	26,50 %	3,20 %	100,00 %
<i>Retinopathie</i>	<i>Nein</i>	Anzahl	118	45	5	168
		Gesamtzahl [%]	63,80 %	24,30 %	2,70 %	90,80 %
	<i>Ja</i>	Anzahl	12	4	1	17
		Gesamtzahl [%]	6,50 %	2,20 %	0,50 %	9,20 %
		<i>Gesamt</i>	Anzahl	130	49	6
		Gesamtzahl [%]	70,30 %	26,50 %	3,20 %	100,00 %

<i>Retinopathie mit Laser- behandlung</i>	Nein	Anzahl	126	48	6	180
		Gesamtzahl [%]	68,50 %	26,10 %	3,30 %	97,80 %
	Ja	Anzahl	3	1	0	4
		Gesamtzahl [%]	1,60 %	0,50 %	0,00 %	2,20 %
	<i>Gesamt</i>	Anzahl	129	49	6	184
		Gesamtzahl [%]	70,10 %	26,60 %	3,30 %	100,00 %
<i>Nephropathie</i>	Nein	Anzahl	103	43	3	149
		Gesamtzahl [%]	55,70 %	23,20 %	1,60 %	80,50 %
	Ja	Anzahl	27	6	3	36
		Gesamtzahl [%]	14,60 %	3,20 %	1,60 %	19,50 %
	<i>Gesamt</i>	Anzahl	130	49	6	185
		Gesamtzahl [%]	70,30 %	26,50 %	3,20 %	100,00 %
<i>Neuropathie</i>	Nein	Anzahl	107	39	4	150
		Gesamtzahl [%]	58,20 %	21,20 %	2,20 %	81,50 %
	Ja	Anzahl	22	10	2	34
		Gesamtzahl [%]	12,00 %	5,40 %	1,10 %	18,50 %
	<i>Gesamt</i>	Anzahl	129	49	6	184
		Gesamtzahl [%]	70,10 %	26,60 %	3,30 %	100,00 %
<i>Diabetes Typ</i>	Typ 1	Anzahl	12	10	1	23
		Gesamtzahl [%]	6,50 %	5,40 %	0,50 %	12,50 %
	Typ 2	Anzahl	117	38	5	160
		Gesamtzahl [%]	63,60 %	20,70 %	2,70 %	87,00 %
	sonstige	Anzahl	0	1	0	1
		Gesamtzahl [%]	0,00 %	0,50 %	0,00 %	0,50 %
<i>Gesamt</i>	Anzahl	129	49	6	184	
	Gesamtzahl [%]	70,10 %	26,60 %	3,30 %	100,00 %	

Daraus resultiert ein trendhafter Zusammenhang ($p = 0,071$) von Nephropathien mit dem Vorhandensein des RS 5918 Polymorphismus (Abbildung 13). Diese Beobachtung korrespondiert gut mit den bereits erwähnten signifikanten laborchemischen Veränderungen der GFR und der Kreatininwerte abhängig vom Genotyp.

Unabhängig vom SNP leiden 10,4 % aller Patienten an einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK), darunter 47,4 % an Grad 2 b. Im Vergleich dazu ist die KHK häufiger mit einer relativen Erkrankungshäufigkeit von 23,8 %. Von allen Patienten, die an einer koronaren Herzerkrankung (KHK) leiden, sind 36,36 % mit einem operativen Bypass versorgt. Aus dem Gesamtkollektiv erlitten 10,8 % der Patienten einen Herzinfarkt. Bei der Behandlung der diabetischen Retinopathie ist erkennbar, dass 23,53 % der Patienten einer Laserbehandlung zur Visusverbesserung zugeführt wurden, wobei hier nicht zwischen der proliferativen und der nicht-proliferativen Retinopathie differenziert wird. Des Weiteren leiden 18,5 % der Patienten an einer klinisch gesicherten Polyneuropathie und 19,5 % an einer Nephropathie. Bezogen auf den untersuchten Polymorphismus finden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen, abgesehen von den Nephropathien.

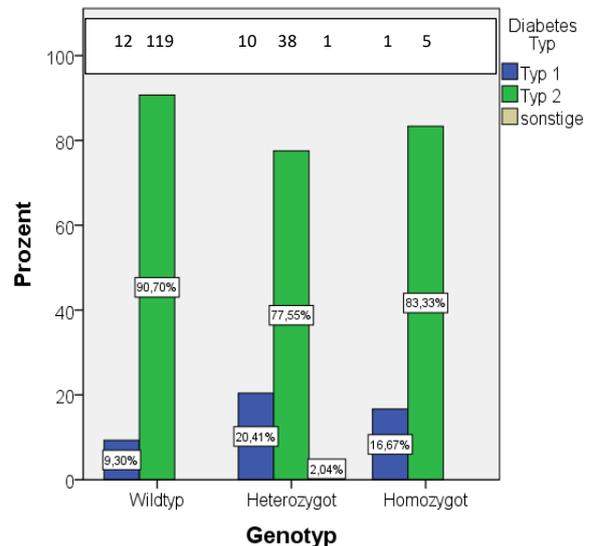


Abbildung 14: Relative prozentuale Verteilung (x-Achse) des Diabetes Typ in den Genotypen. Genaue Prozentangaben sind in den Balken zu finden. Absolute Zahlen sind im weißen Kasten am oberen Rand zu finden. Unter "sonstige" sind alle Diabetestypen inbegriffen, die nicht den Kriterien des Typ 1 oder Typ 2 Diabetes Mellitus entsprechen (lediglich bei der heterozygoten Gruppe).

Typ 1 Diabetiker sind häufiger mindestens haploinsuffizient für den RS 5918 Polymorphismus des Integrin β 3 Gen im Vergleich zu den Typ 2 Diabetikern ($p = 0,069$). In der für den Polymorphismus heterozygoten Gruppe sind mehr Typ 1 Diabetiker (20,41 %) als in der Wildtypgruppe (9,3 %) (Abbildung 14).

3.2 Monozytenkultivierung

Die Kultivierungsergebnisse der drei etablierten Methoden zur Kultivierung der isolierten humanen Monozyten werden anhand von drei Kriterien semiquantitativ verglichen (Tabelle 18). Dabei zeigt das verwendete DMEM Medium die schlechtesten Ergebnisse und das X-VIVO™ 10 Medium die besten Ergebnisse in Bezug auf Vitalität, Zelldichte und Morphologie. Die Kultivierungsergebnisse mit dem RPMI 1640 Medium mit humanen Serumzusätzen zeigt zum Teil Unterschiede zwischen den verschiedenen Herstellern, liefert aber im Allgemeinen durchschnittliche Ergebnisse in Bezug auf die Zelldichte.

Tabelle 18: Übersichtstabelle über die verwendeten Kulturmedien mit deren Kultivierungsergebnissen. Dabei zeigt „-“ ein schlechtes bzw. „-“ sehr schlechtes Ergebnis und „+“ ein gutes bzw. „++“ sehr gutes Ergebnis an.

<i>Kulturmedium</i>	<i>Vitalität</i>	<i>Zelldichte</i>	<i>Morphologie</i>
<i>DMEM mit 10 % Eigenserum</i>	--	--	--
<i>RPMI 1640 mit 10 % humanem Serum von Capricorne</i>	+	+	-
<i>RPMI 1640 mit 10 % humanem Serum von Sigma</i>	+	+	-
<i>RPMI 1640 mit 10 % humanem Serum von Pan Biotech</i>	+	-	-
<i>X-VIVO™ 10 + M-CSF [100 ng/ml]</i>	++	++	++

Die Beurteilung der Qualität basiert auf den lichtmikroskopischen Aufnahmen der Zellansätze (Abbildung 15) sowie auf Evaluation der Vitalität. Bei Verwendung des DMEM Mediums ändert sich die Zellmorphologie bei geringer Zelldichte nicht (Abbildung 15 Bild A). Mit dem RPMI 1640 Medium (Abbildung 15 Bilder B - D) bilden die Makrophagen kleine vesikelähnliche intrazelluläre Strukturen aus, die unter dem Lichtmikroskop blau erscheinen. Dieses Phänomen ist bei allen Ansätzen mit dieser Methode erkennbar. Teilweise bilden die Makrophagen kleine Pseudopodien aus, wobei sie ihre rundliche Form nicht verlieren. Bei Verwendung des X-VIVO™ 10 Medium (Abbildung 15 Bild E) mit einem M-CSF Zusatz [100 ng/ml] sind die zunächst undifferenzierten Monozyten rund, scharf begrenzt und besitzen annähernd die gleiche Größe (Abbildung 16 Bild A). Im Verlauf bilden die Zellen immer längere Pseudopodien aus (Abbildung 16 Bilder B und C), sodass sie ihre rundliche Form verlieren (Abbildung 16 Bild D) und die Zelldichte bis zum siebten Tag ansteigt (Abbildung 16 Bild E).

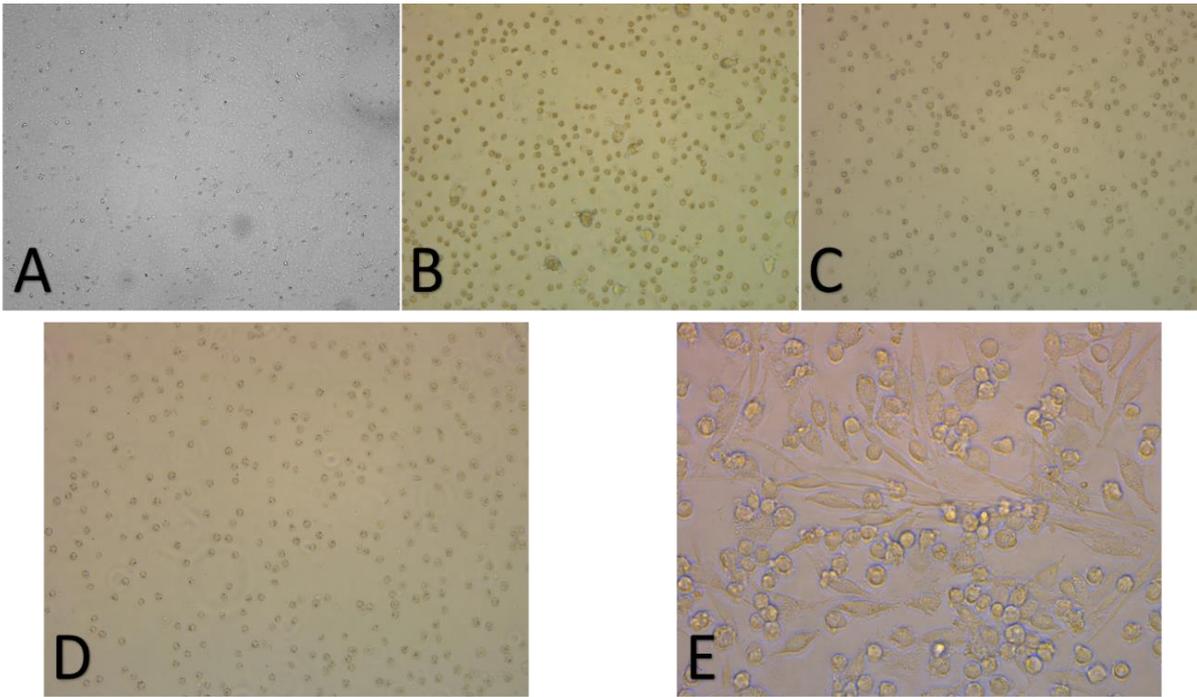


Abbildung 15: Dargestellt sind representative Bilder der Zellkultivierungsergebnisse an Tag sieben in verschiedenen Zellmedien in 12-Loch Platten. Bild A zeigt Zellen, die in DMEM Medium kultiviert wurden, Bilder B, C und D zeigen Zellen in RPMI 1640 Medium und Bild E zeigt das Ergebnis, das durch die Verwendung von X-VIVO™ 10 Medium erzielt werden konnte. Die Bilder A – D wurden mit Vergrößerung 400 x und das Bild E wurde mit der Vergrößerung 600 x aufgenommen.

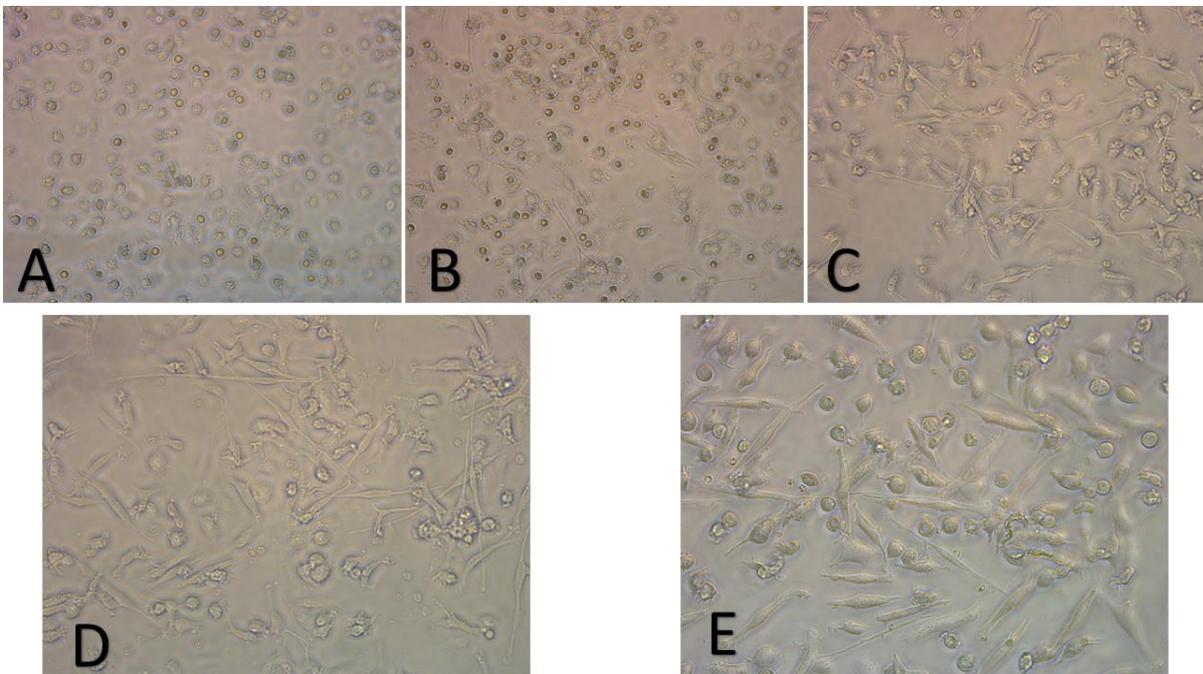


Abbildung 16: Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Zellkultivierung in X-VIVO™ 10 Medium mit einem M-CSF [100 ng/ml] Zusatz in 12-Loch Platten. Bild A zeigt die frisch ausgesäten Monozyten. Bild B zeigt Tag zwei, Bild C Tag drei und Bild D Tag fünf. In Bild E ist das Ergebnis der Kultivierung an Tag sieben dargestellt. Die Bilder A – C wurden mit Vergrößerung 400 x und die Bilder D - E mit der Vergrößerung 600 x aufgenommen.

3.3. Immunzytochemie

Der Nachweis der regelrechten Differenzierung der Monozyten zu funktionsfähigen, Integrin $\beta 3$ + Makrophagen erfolgt mittels immunzytochemischer Verfahren (Abbildung 17). Dabei zeigt die dritte Spalte der Abbildung 17 Überlagerungsbilder der ersten beiden Spalten, um eine bessere Differenzierung der Signale zu ermöglichen. Die kultivierten Zellen exprimieren unabhängig ihrer Zellmorphologie das makrophagenspezifische EMR 1 (EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1) (Abbildung 17 Bilder C und F). Die Funktionalität der Makrophagen kann durch Phagozytose des Dil-oxLDL [20 $\mu\text{g/ml}$] nach Inkubation für 48 h gezeigt werden (Abbildung 17 Bild I). Alle kultivierten Zellen exprimieren Integrin $\beta 3$ auf ihrer Oberfläche (Abbildung 17 Bild L).

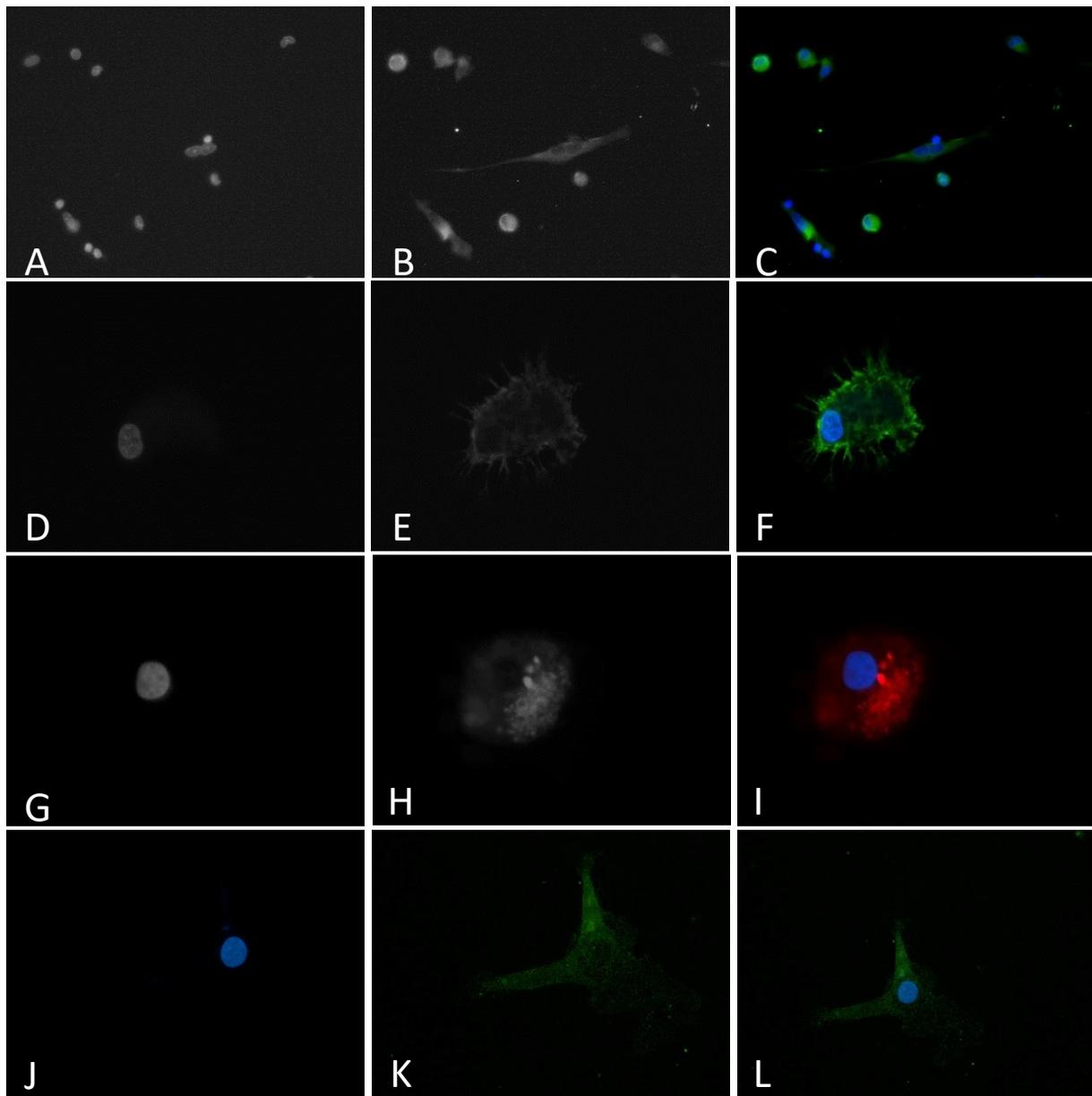


Abbildung 17: Immunzytochemischer Nachweis der Differenzierung von Monozyten zu Integrin $\beta 3$ +, funktionsfähigen Makrophagen. Das Signal des DAPI Antikörpers zur Darstellung der Zellkerne ist in allen Bildern blau/grau. In der ersten Spalte befindet sich das DAPI Signal, in der zweiten Spalte das jeweils nachzuweisende Antigen und die dritte Spalte zeigt Überlagerungsbilder. Bilder B, C, E und F zeigen den Nachweis von EMR 1. Bilder H und I zeigen durch Inkubation mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Dil-oxLDL eine regelrechte Funktionsweise der Makrophagen. Der Integrin $\beta 3$ (grün fluoreszierend) Nachweis zeigt sich in Bilder K und L. Vergrößerung 1000 x.

3.4 Zellstimulation

Nach der erfolgreichen Differenzierung der isolierten humanen Monozyten zu Makrophagen werden diese mit LPS, PMA und Interferon γ nach gängigen Protokollen aus der Literatur (Kapitel 2.10) stimuliert. Die Makrophagen ändern reaktiv ihre Zellmorphologie, abhängig vom jeweiligen Stimulus. Lichtmikroskopisch ist zu beobachten, dass nicht alle Zellen einer Zellkultur in gleichem Maße auf die jeweilige Stimulation reagieren. Ein Zusammenhang zwischen dem *in vitro* Verhalten der Makrophagen mit unterschiedlichen Faktoren (z. B. Zelldichte, Zellmorphologie) kann nicht gezeigt werden. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Abbildung 18 A) bewirkt eine Stimulation mit LPS die Ausbildung von intrazellulären vesikelähnlichen Strukturen (Abbildung 18 B). Zudem scheinen die Zellen intrazellulär aufgelockert zu sein. Durch eine Stimulation mit PMA haben die Zellen ebenfalls intrazelluläre vesikelähnliche Strukturen ausgebildet und wirken aufgelockert (Abbildung 18 C). Die Zellgrenzen sind nicht mehr scharf erkennbar, was auf ein flächiges Wachstum der Zellen schließen lässt. Die mit Interferon γ stimulierten Zellen (Abbildung 18 D) zeigen lange, schlanke Pseudopodien, und die intrazellulären vesikelähnlichen Strukturen sind sehr rar ausgeprägt. Die Zelldichte scheint vergleichbar mit der Kontrolle zu sein.

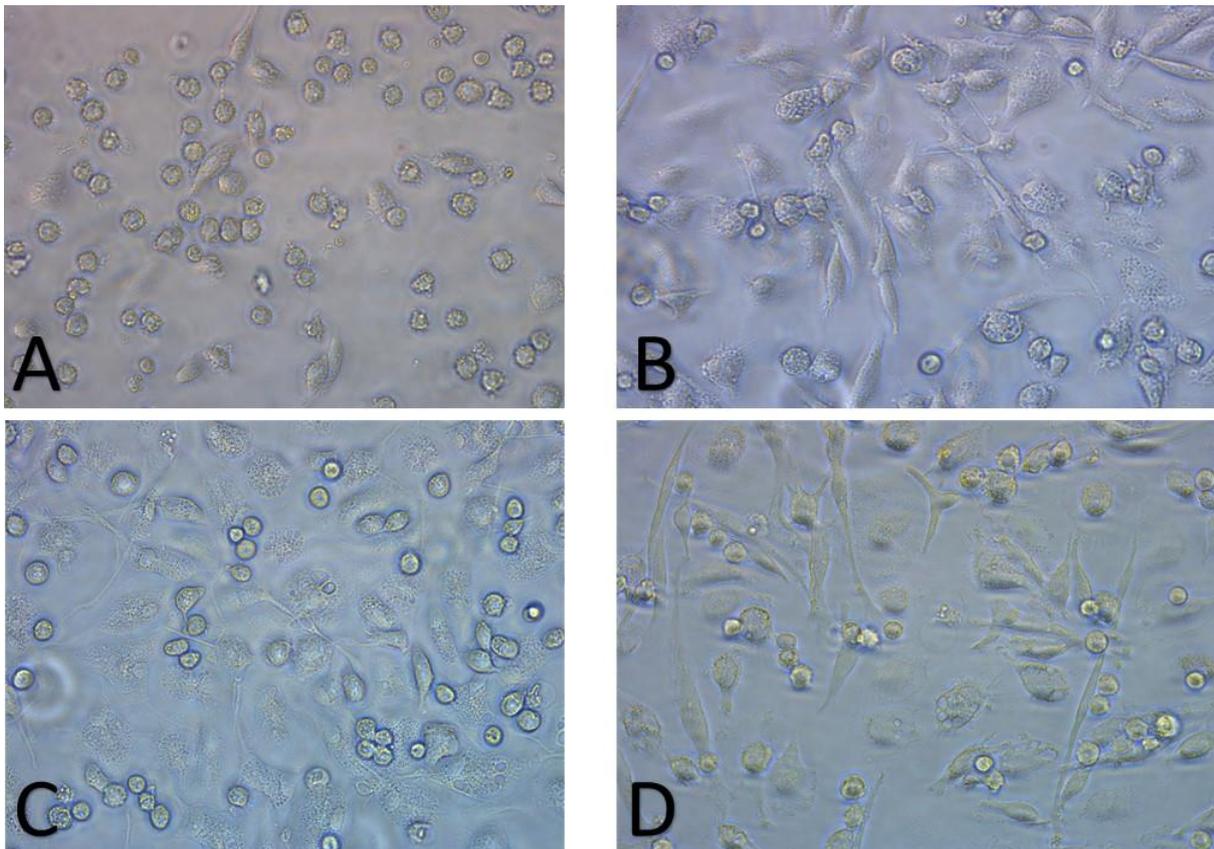


Abbildung 18: Dargestellt sind lichtmikroskopische Aufnahmen von Makrophagen, die in 12-Loch Platten mit verschiedenen Stimuli behandelt wurden. Bild A zeigt dabei die unstimulierte Kontrolle. In Bild B sind Makrophagen abgebildet, die für 8 h mit 100 ng/ml LPS behandelt wurden. Bild C zeigt Makrophagen, die mit 200 nM einer PMA Lösung für 24 h stimuliert wurden und Bild D zeigt die Auswirkungen einer Stimulation mit 50 ng/ml Interferon γ für 24 h. Vergrößerung 600 x.

Nach zellmorphologischer Untersuchung wird die Proteinkonzentration in den stimulierten Makrophagen quantifiziert (Abbildung 19). Die Proteinkonzentration kann annäherungsweise als Marker für die Proliferation und die Vitalität der Zellen herangezogen werden, da nur vitale Zellen an die Zellkulturplatte adhären. Dabei werden alle vitalen Zellkulturen der insgesamt 21 eingeschlossenen Patienten gemessen (unstimulierte Makrophagen N = 21; mit LPS stimulierte Makrophagen N = 21; mit PMA stimulierte Makrophagen N = 16; mit Interferon γ stimulierte Makrophagen N = 17). Durch die LPS Stimulation kann eine signifikante Reduktion ($p < 0,001$) der Proteinkonzentration gegenüber den unstimulierten Makrophagen von 1,332 mg/ml (0,41) auf 1,27 mg/ml (0,6) beobachtet werden. Eine Stimulation mit PMA und Interferon γ erhöht die Proteinkonzentration auf 1,45 mg/ml (0,35) bzw. 1,46 mg/ml (0,56). Die Proteinkonzentrationen der Zellansätze jedes Patienten zeigen interindividuelle Unterschiede (Appendix I; Abbildung I).

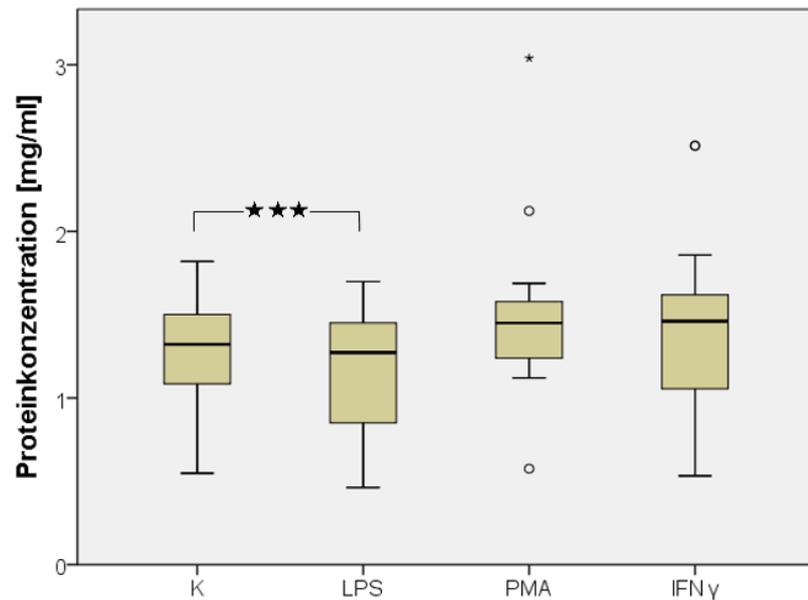


Abbildung 19: Mediane der Proteinkonzentrationen aller Patienten, die für den Stimulus aufgeschlüsselt und im Boxplot dargestellt sind. Drei Sterne geben ein Signifikanzniveau von $p < 0,001$ an.

Nach erfolgreicher Stimulation wird die inflammatorische Reaktion der Makrophagen mittels Konzentrationsbestimmung verschiedener Zytokine quantifiziert (Tabelle 19). Die gemessenen Zytokinkonzentrationen sind auf die Proteinkonzentration normalisiert. 19 der insgesamt 25 gemessenen Zytokine des Multiplex-Elisa können analysiert werden. Ausgeschlossen werden Eotaxin, IP 10, Interleukin-4, Interleukin-5, Interleukin-13 und Interleukin-17. Die erstellten Standardkurven der ausgeschlossenen Zytokine erscheinen fehlerhaft, da die Abweichungen zwischen den jeweils gemessenen Werten der Doppelbestimmung außerhalb der zulässigen Norm liegen. Daher ist eine valide Konzentrationsbestimmung nicht möglich. Es zeigt sich, dass im Vergleich zu den unstimulierten Makrophagen, die Konzentration aller Zytokine signifikant durch eine LPS Stimulation erhöht wird. Ausnahmen sind IL 1 RA. Ein ähnliches Muster zeigt sich bei einer PMA Stimulation, die ebenfalls zu einer signifikanten Konzentrationserhöhung der Zytokine führt, außer bei MIP 1 α . Die Reaktion der Makrophagen auf Interferon γ zeigt sich in einer signifikanten Konzentrationserhöhung von IL 1 RA, Interferon α , MCP 1 und MIG 1. In Appendix I; Abbildung II sind die zusammengefassten Ergebnisse aus Tabelle 19 separat in Boxplots visualisiert.

Tabelle 19: Übersicht über die signifikanten Einflüsse der Stimuli gegenüber der Kontrolle für die einzelnen Zytokine und MPO. \uparrow bedeutet eine gesteigerte Sekretion und \downarrow symbolisiert eine verringerte Sekretion. ¹ Ergebnis ist nicht signifikant, da die Kontrollen unterhalb des Messniveaus lagen; p-Werte sind angegeben.

Zytokin	LPS	PMA	Interferon γ	p-Werte
<i>IL 1 RA</i>		\uparrow	\uparrow	< 0,001 / < 0,05
<i>IL 2 R</i>	\uparrow	\uparrow		< 0,05
<i>IL 6</i>	\uparrow	\uparrow		< 0,01
<i>IL 7</i>	\uparrow	\uparrow		< 0,05
<i>IL 8</i>	\uparrow	\uparrow		< 0,01
<i>IL 12</i>	\uparrow	\uparrow		< 0,01
<i>Interferon α</i>	\uparrow	\uparrow	\uparrow	< 0,001
<i>MCP 1</i>	\uparrow	\uparrow	\uparrow	< 0,001
<i>MIG 1¹</i>	\uparrow	\uparrow	\uparrow	
<i>MIP 1 α</i>	\uparrow			< 0,05
<i>MIP 1 β</i>	\uparrow	\uparrow		< 0,001
<i>Rantes</i>	\uparrow	\uparrow		< 0,01 / < 0,05
<i>Enzym</i>				
<i>MPO</i>	\downarrow			< 0,01

Da MPO nicht zu den klassischen Zytokinen zählt, folgt eine gesonderte Betrachtung. Die Konzentration des MPO ist auf die Proteinkonzentration normalisiert. Bei Betrachtung des Einflusses der verschiedenen Stimuli auf die Sekretion des MPO unabhängig vom Genotyp zeigt sich, dass eine LPS Stimulation die Menge an freigesetztem MPO signifikant ($p = 0,002$) von einem Median von 3,04 pg/ml (4,83) auf 2,06 pg/ml (2,3) reduziert (Abbildung 20). Eine PMA Stimulation zeigt eine trendhafte ($p = 0,08$) Steigerung in der MPO Freisetzung von einem Median von 3,04 pg/ml (4,83) auf 4,50 pg/ml (5,70). Die abgegebene MPO Menge wird scheinbar nicht durch Interferon γ beeinflusst.

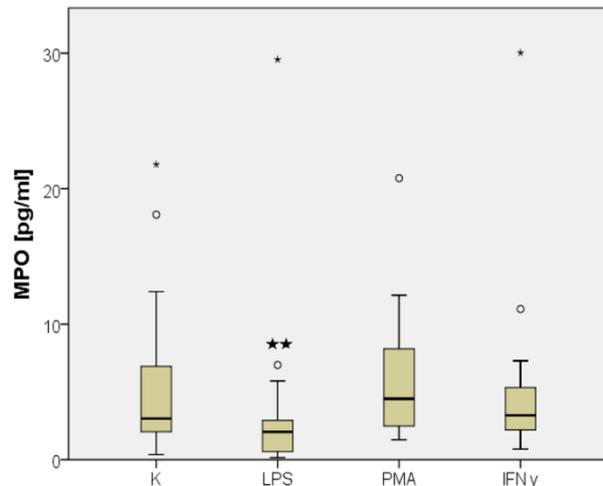


Abbildung 20: MPO Konzentration im Zellüberstand nach verschiedenen Stimuli, ohne Berücksichtigung des Genotyps im Boxplot dargestellt; normalisiert auf Proteinkonzentration; K = Kontrolle.

3.5 Genotypabhängige Zytokin- und MPO-Sekretionen

Bei der Überprüfung eines möglichen Einflusses des RS 5918 Polymorphismus auf die inflammatorische Aktivität der kultivierten Makrophagen (Abbildung 21) zeigt sich kein einheitlicher und signifikanter Einfluss auf die inflammatorische Reaktion der kultivierten Makrophagen. Bei genauerer Betrachtung der Ergebnisse zeichnen sich aber trendhafte Assoziationen zwischen dem untersuchten Polymorphismus und einzelnen Zytokinen ab.

Es ist durch eine LPS und PMA ($p = 0,03$) Stimulation bei Makrophagen von Patienten mit einem mindestens heterozygotem Polymorphismus am Genlocus ein Trend zu höheren GM-CSF Werten erkennbar (Abbildung 21 A). Hier könnte eine verstärkte Sekretion von GM-CSF durch das Vorliegen des untersuchten Polymorphismus postuliert werden. Es existiert außerdem ein signifikanter Unterschied ($p = 0,016$) zwischen der Interleukin 1 β Ausschüttung (Abbildung 21 B) durch eine PMA Stimulation zwischen den Makrophagen der heterozygoten und homozygoten Patienten. Die Makrophagen der heterozygoten Patienten sezernieren zudem mehr Interleukin 1 β durch eine Interferon γ Stimulation in den Überstand, verglichen mit den Makrophagen der beiden anderen Genotypen. Die Rantes Freisetzung (Abbildung 21 C) unter einer Interferon γ Stimulation zeigt einen trendhaften Unterschied zwischen den Makrophagen der Wildtypträgern und den Trägern des homozygoten Allels des Polymorphismus ($p = 0,079$). Die LPS getriggerte Rantes Freisetzung unterscheidet sich signifikant ($p = 0,015$) zwischen den Makrophagen der Wildtyppatienten und den

Makrophagen der homozygoten Allelträger für den Polymorphismus. Genotypabhängige Unterschiede sind bei Interleukin 2 R nicht feststellbar. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,016$) zwischen der Interleukin 7 (Abbildung 21 H) Sekretion unter einer PMA Stimulation zwischen den Makrophagen der für das Allel des Polymorphismus heterozygoten und homozygoten Patienten. Die verwendeten Stimulanzien der Makrophagen zeigen bei den Makrophagen der Wildtyppatienten den geringsten Effekt auf die Interleukin 7 Sekretion. Die Werte bewegen sich in einer Größenordnung von < 100 pg/ml.

Bei Verwendung des dominanten Modells wird eine trendhafte Reduktion der Sekretion von Interleukin 15 (Abbildung 21 L) bei LPS oder Interferon γ Stimulation durch das Vorliegen des Polymorphismus erkennbar. Durch eine PMA Stimulation ist eine starke Konzentrationserhöhung von MIP 1 α (Abbildung 21 P) im Zellüberstand aller Makrophagen zu sehen. Diese Steigerung fällt bei den Makrophagen der für den untersuchten Polymorphismus heterozygoten Patienten am stärksten aus und unterscheidet sich signifikant ($p = 0,048$) von den Makrophagen der für den RS 5918 Polymorphismus homozygoten Patienten. Im Gegensatz zu MIP 1 α ist die MIP 1 β Sekretion (Abbildung 21 Q) am stärksten durch eine LPS Stimulation getriggert. Unstimulierte Makrophagen sezernieren zu wenig TNF α (Abbildung 21 R), um es mit der verwendeten Messmethode zu detektieren. Die kleinste messbare Konzentration liegt bei $< 0,6$ pg/ml. Die TNF α Sekretion fällt unter einer LPS Stimulation bei den Makrophagen der für den untersuchten Polymorphismus heterozygoten Patienten verglichen mit den Makrophagen der Wildtyppatienten signifikant ($p = 0,017$) stärker aus. Eine Interferon γ Stimulation zeigt geringe Effekte auf die TNF α Konzentration (< 50 pg/ml). Der Konzentrationsmedian der Makrophagen der für den untersuchten Polymorphismus heterozygoten Patienten liegt weit oberhalb der Mediane der anderen Genotypen.

Interleukin 1 RA, Interleukin 2, Interleukin 6, Interferon 8, Interleukin 10, Interleukin 12, Interferon α , Interferon γ , MCP 1 und MIP 1 β , MPO (Abbildung 22) zeigen keine genotypabhängigen Unterschiede der Konzentration im Zellüberstand.

Insgesamt zeigt sich ein heterogenes Bild und kein eindeutiger Trend zu signifikanten Auswirkungen des untersuchten Polymorphismus auf die inflammatorische Aktivität von Makrophagen.

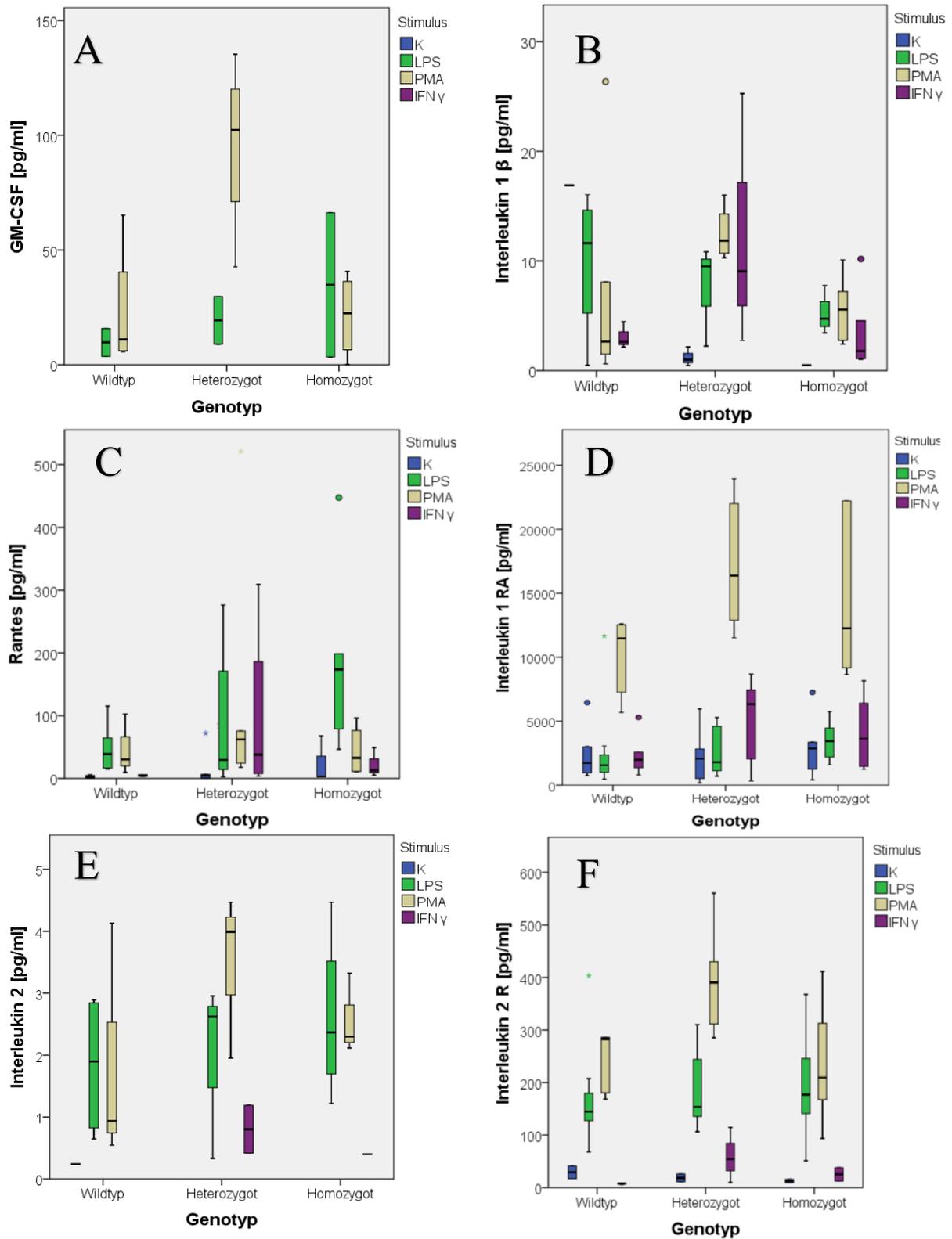
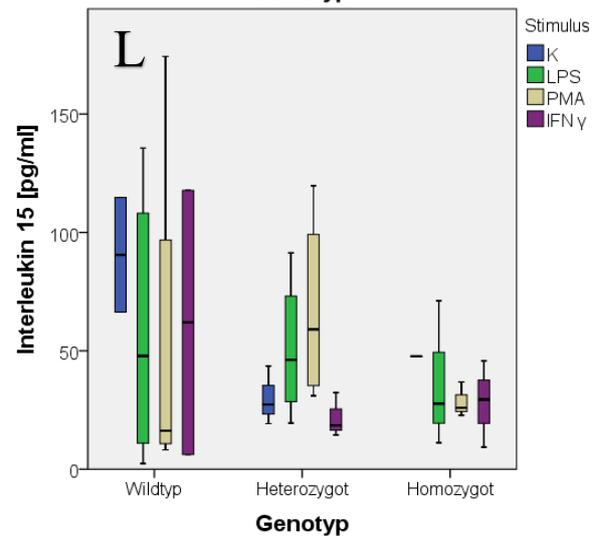
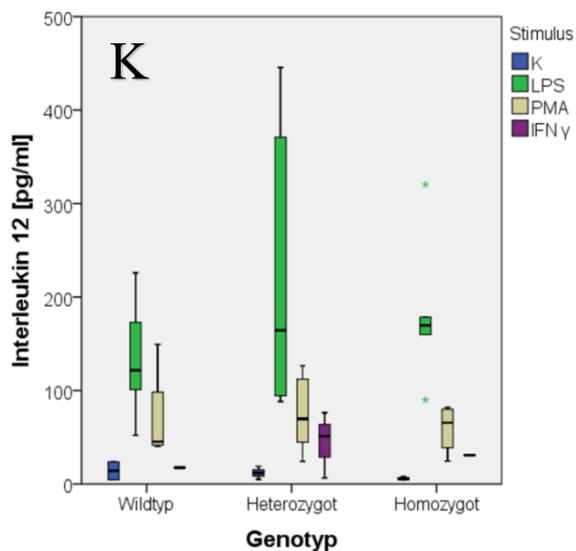
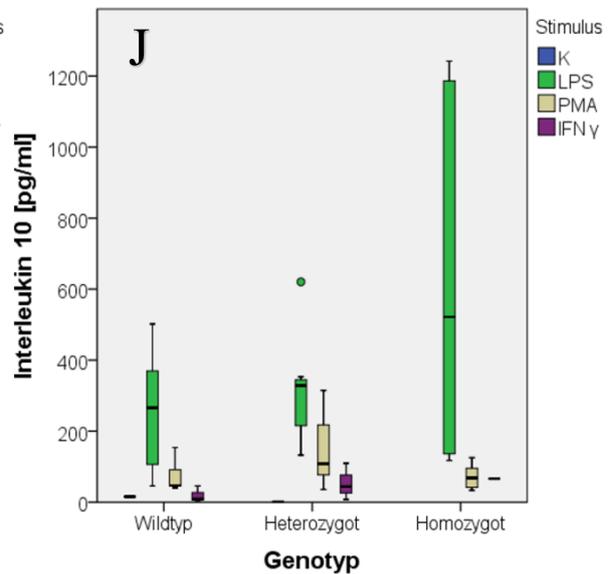
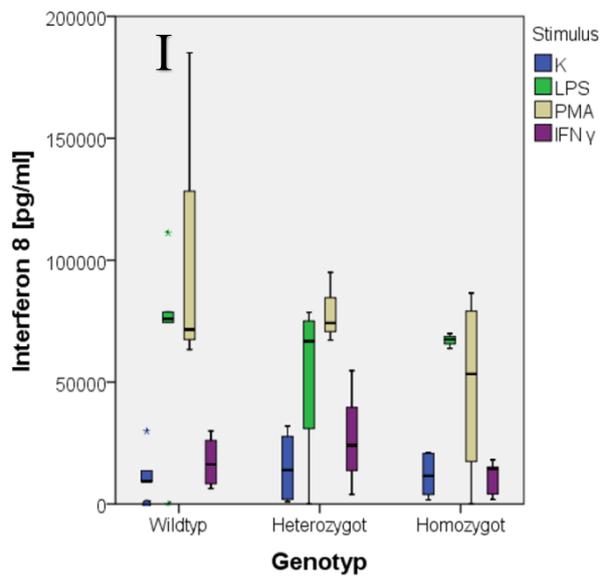
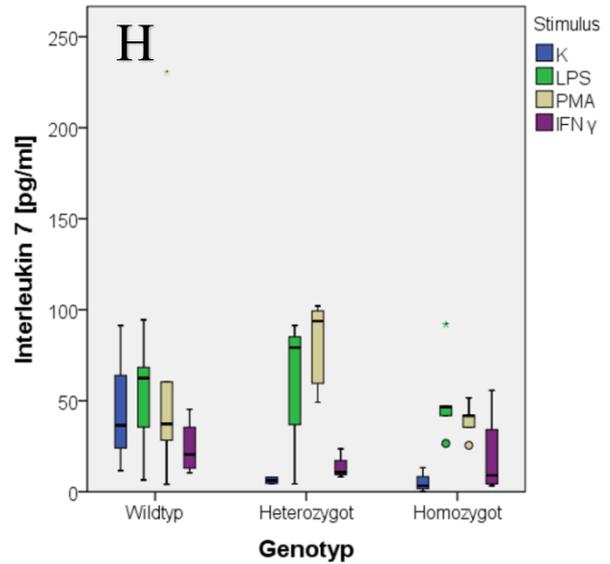
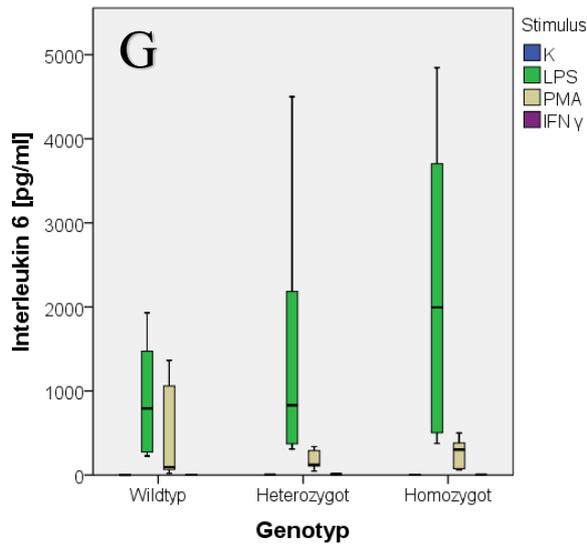
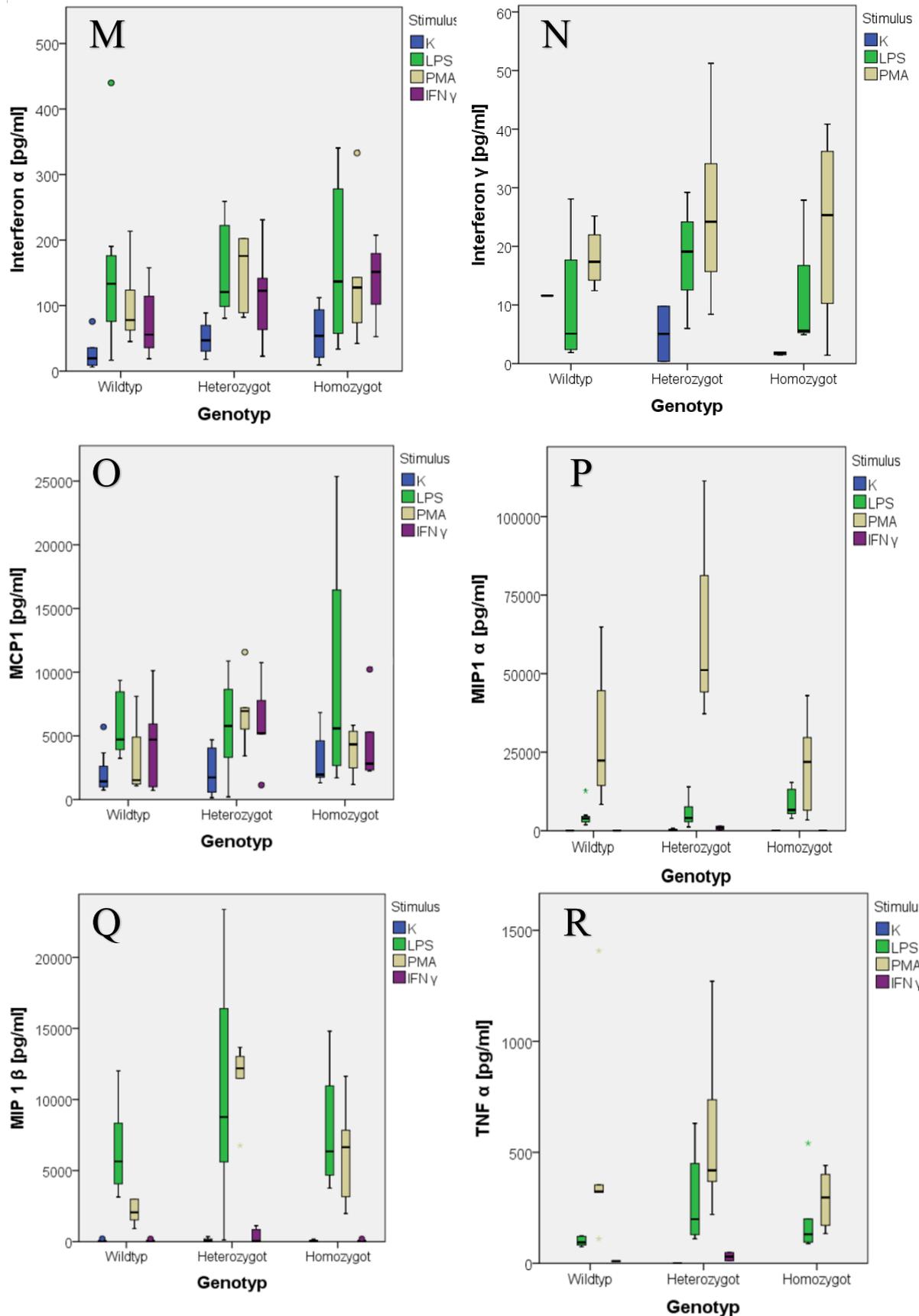


Abbildung 21: Dargestellt sind die Boxplots, auf deren y-Achse die Konzentration des jeweiligen Zytokins mit dazugehörigen Einheiten aufgetragen ist. Auf der x-Achse werden die unterschiedlichen Genotypen dargestellt. Dabei ist jeder einzelne Genotyp in vier Unterkategorien aufgeteilt, deren farbliche Codierung in der Legende zu finden ist. Die blauen Balken zeigen die Kontrollen (K), die grünen Balken LPS, die gelben Balken PMA und die violetten Balken Interferon γ .



Fortsetzung Abbildung 21: Dargestellt sind die Boxplots, auf deren y-Achse die Konzentration des jeweiligen Zytokins mit dazugehörigen Einheiten aufgetragen ist. Auf der x-Achse werden die unterschiedlichen Genotypen dargestellt. Dabei ist jeder einzelne Genotyp in vier Unterkategorien aufgeteilt, deren farbliche Codierung in der Legende zu finden ist. Die blauen Balken zeigen die Kontrollen (K), die grünen Balken LPS, die gelben Balken PMA und die violetten Balken Interferon γ .



Fortsetzung Abbildung 21: Dargestellt sind die Boxplots, auf deren y-Achse die Konzentration des jeweiligen Zytokins mit dazugehörigen Einheiten aufgetragen ist. Auf der x-Achse werden die unterschiedlichen Genotypen dargestellt. Dabei ist jeder einzelne Genotyp in vier Unterkategorien aufgeteilt, deren farbliche Codierung in der Legende zu finden ist. Die blauen Balken zeigen die Kontrollen (K), die grünen Balken LPS, die gelben Balken PMA und die violetten Balken Interferon γ .

Fortsetzung Abbildung 21: Dargestellt sind die Boxplots, auf deren y-Achse die Konzentration des jeweiligen Zytokins mit dazugehörigen Einheiten aufgetragen ist. Auf der x-Achse werden die unterschiedlichen Genotypen dargestellt. Dabei ist jeder einzelne Genotyp in vier Unterkategorien aufgeteilt, deren farbliche Codierung in der Legende zu finden ist. Die blauen Balken zeigen die Kontrollen (K), die grünen Balken LPS, die gelben Balken PMA und die violetten Balken Interferon γ .

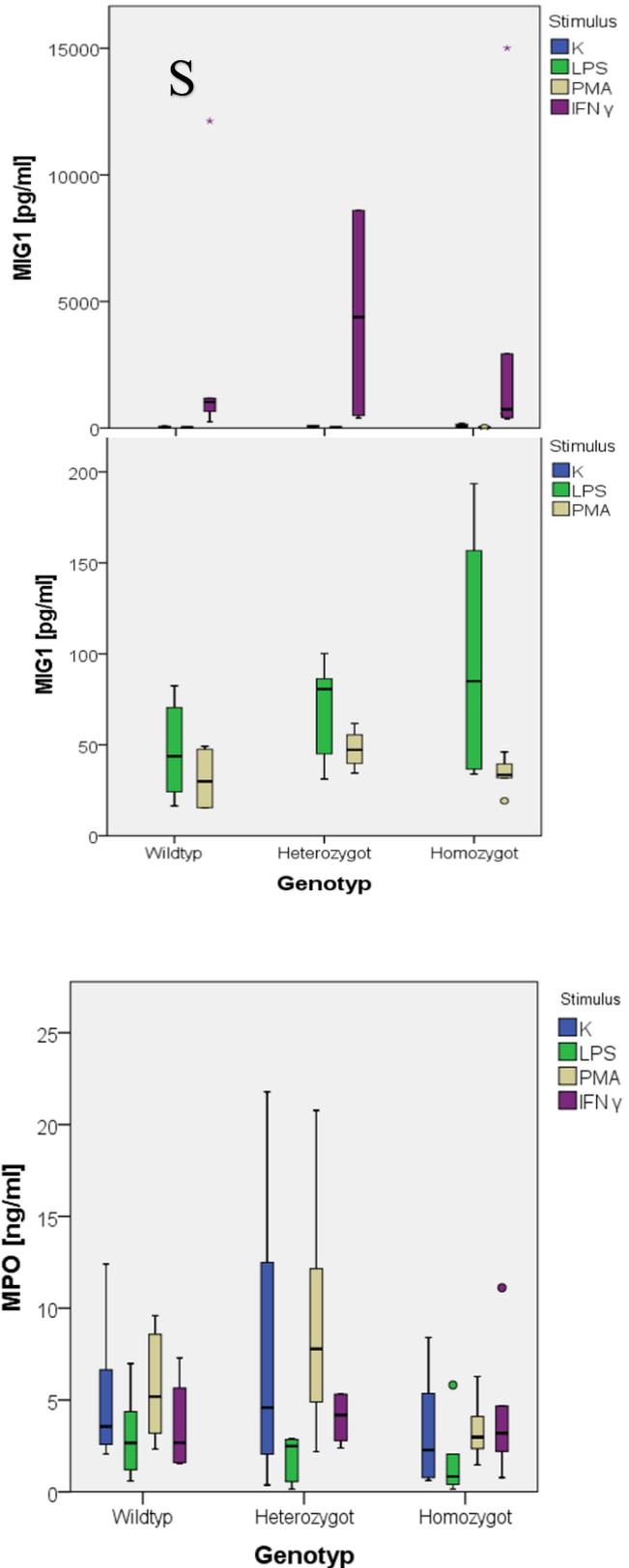


Abbildung 22: MPO Konzentration im Zellüberstand nach verschiedenen Stimuli, stratifiziert für den Genotyp und in einem Boxplot dargestellt.

4. Diskussion

4.1 Prävalenz des RS 5918 Polymorphismus

In dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass 3,23 % der untersuchten Diabetiker homozygot und 26,34 % heterozygot für den RS 5918 Polymorphismus sind. Verglichen mit einer Studie, die eine Assoziation zwischen der Häufigkeit von Diabetes Mellitus mit dem Polymorphismus nachweisen kann und die eine ähnlich große Patientenpopulation untersucht, zeigt sich, dass in beiden Studien die Gesamthäufigkeit von heterozygoten und homozygoten Genträgern etwa gleich ist. Diese Studie von D. Tschoepe et al. zeigt, dass 34,8 % der an Diabetes Mellitus erkrankten Probanden hetero- oder homozygot für den Polymorphismus sind. Die Quote bei Nicht-Diabetikern ist mit 14,6 % niedriger [17]. In einer anderen Studie, in der 858 Probanden untersucht werden, zeigt sich, dass unter den Diabetikern 25,7 % heterozygot und 1,9 % homozygot für den untersuchten Polymorphismus sind [82]. Jedoch ist die Vergleichbarkeit der Studien eingeschränkt, da verschiedene Populationen betrachtet werden. Die zweite zitierte Studie untersucht indigene Völker Sibiriens, wohingegen die Arbeitsgruppe um Tschoepe et al. ein deutsches Patientenkollektiv untersucht. Es kann daraus gefolgert werden, dass die Prävalenz des Polymorphismus unter anderem von ethnischen Faktoren abhängig ist, was auch eine weitere wissenschaftliche Arbeit postuliert [83]. Einen wahrscheinlichen Zusammenhang zwischen dem Diabetes Mellitus und dem untersuchten RS 5918 Polymorphismus zeigt eine Studie an Diabetikern, die eine Assoziation des Polymorphismus mit erhöhten HbA1c-Werten feststellt [18]. Dieser Zusammenhang kann in der hier vorliegenden Arbeit allerdings nicht bestätigt werden ($p = 0,827$).

4.2 Rolle von Integrin β 3 bei Diabetes Mellitus und seinen Folgeerkrankungen

Es gibt Unterschiede zwischen der Proteinexpression und der RNA Expression des Integrin β 3 Proteins in bestimmten Geweben und in Abhängigkeit von der Situation (Abbildung 23). Bei gesunden Personen ist eine ubiquitäre Expression der Integrin β 3 RNA nachweisbar, allerdings exprimieren nur das Knochenmark und Teile des Immunsystems das Integrin β 3 Protein in relevanten Mengen. Wie diese Arbeit zeigt, exprimieren auch differenzierte Makrophagen das Integrin β 3 Protein. Bei pathologischen Vorgängen im Organismus kann sich das Expressionsmuster des Integrin β 3 Proteins verändern, wie beispielsweise bei verschiedenen Nephropathien [84]. Aus diesem Grunde liegt es nahe, Häufigkeit und Verlauf der diabetischen Nephropathie bei Trägern des RS 5918 Polymorphismus und konsekutiver konstitutioneller Aktivierung des Integrin β 3 [15] mit Trägern des Wildtyp Allels zu vergleichen.

Die vorliegende Arbeit zeigt einen trendhaften Zusammenhang zwischen dem Auftreten von diabetischer Nephropathie mit dem Trägerstatus des RS 5918 Polymorphismus. Es kann daher über eine Rolle der β 3-Untereinheit enthaltenden Integrinen bei dieser Erkrankung spekuliert werden. Eine erhöhte Expression von Integrin β 3 konnte bereits 1996 in den Epithelzellen der Nieren von an diabetischer Nephropathie erkrankter Patienten beobachtet werden [85]. Dazu passt auch das Resultat einer Studie, die einen Podozytenschaden durch die Aktivierung von Integrin β 3 nachweisen kann [86]. Eine neue Studie kommt zu dem Ergebnis, dass α v β 3 ein wichtiger Co-Rezeptor bei der Entwicklung der diabetischen Nephropathie ist [88]. Zudem kann in Mausmodellen gezeigt werden, dass der Vitronectinrezeptor α v β 3 und auch Integrin β 1 in der Pathophysiologie der Nephropathie eine wichtige Rolle spielen. Der α v β 3 beeinflusst die Angiogene- nese [87] via

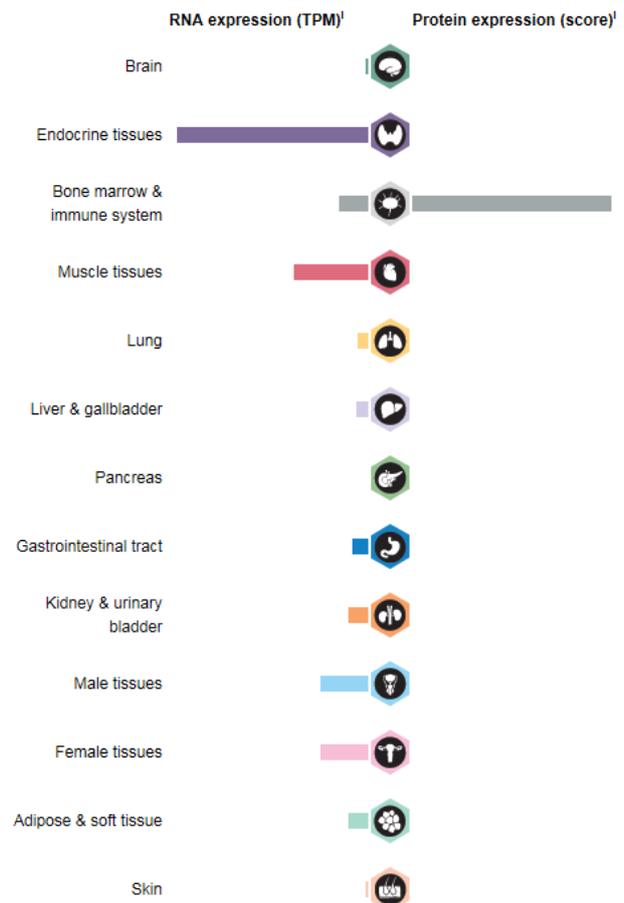


Abbildung 23: RNA-Expression und Protein-Expression des Integrin beta 3 in verschiedenen humanen Geweben (Quelle: The Human Protein Atlas, RNA and Protein Expression summary, unter <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000259207-ITGB3/tissue>, abgerufen am 21.12.2019 17:08 Uhr).

Stimulation des VEGFR-2 [89] und die Permeabilität von Gefäßen [90]. Zudem resultiert eine Aktivierung von α v β 3 in einer Umorganisation des Zytoskletts der Podozyten, sodass sich die Plastizität der Zellen und damit einhergehend die Barrierefunktion ändert [91]. Denkbar wäre auch eine Aktivitätsänderung von α v β 3 durch eine polymorphismusbedingte Konformationsänderung des Integrin β 3, die Auswirkungen auf die Angiogenese der Niere hat und somit die Entstehung und die Progression speziell in der Frühphase der diabetischen Nephropathie begünstigen könnte. Durch Inhibieren des α v β 3 in Mausmodellen mit verschiedenen Medikamenten kann eine signifikante Senkung der Albuminurie im Vergleich zu einer Kontrollgruppe erzielt werden [92, 93]. Das dort verwendete Medikament (MK-0429) inhibiert auch andere Integrine, wodurch keinem Integrin in dieser Studie ein selektiver Effekt zugeordnet werden kann. Ein möglicher Erklärungsansatz ist, dass Osteopontin als Aktivator des α v β 3 [94] in den Nieren durch eine diabetische Nephropathie vermehrt exprimiert wird [95]. Diese Theorie wird von der Erkenntnis unterstützt, dass eine Senkung des Osteopontinlevels zu einer verringerten Albuminurie führt [94, 95]. Aber nicht nur bei der diabetischen Nephropathie alleine ist α v β 3 involviert, sondern auch bei der Fibrosierung der Nieren, unabhängig der Ätiologie [96]. Eine Aktivierung des α v β 3 kann zu einer gesteigerten inflammatorischen Aktivität

von humanen Makrophagen führen [97]. Dazu konträr stehen die Ergebnisse einer weiteren Studie im Mausmodell, die sich lediglich mit der Frühphase der diabetischen Nephropathie beschäftigt. Hier kann keine erhöhte Expression von Integrin β 3 nachgewiesen werden [98]. Die Ergebnisse dieser Studie legen daher nahe, dass Integrine nicht in der primären Phase der Pathophysiologie beteiligt sind. Dies wiederum zeigt die Inhomogenität der bestehenden Literatur zum Einfluss der Integrine, besonders in der Frühphase der Pathophysiologie der diabetischen Nephropathie. In Zusammenschau der bestehenden Literatur liegt aber ein Zusammenhang zwischen der Aktivität und Expression des Integrin β 3 Proteins mit der diabetischen Nephropathie nahe. Die Daten der vorliegenden Arbeit suggerieren bei Patienten mit dem Wildtypallel einen gewissen Schutz vor Nephropathien. Durch eine Blockierung des α v β 3 könnte daher ein möglicher Therapieansatz in der Senkung der Albuminurie und Progression der diabetischen Nephropathie liegen. Vorher wäre eine prospektive Studie mit einer größeren Patientenkohorte bezüglich des Zusammenhangs der diabetischen Nephropathie mit dem Polymorphismus anzustreben. Aus diesem Grund sind zukünftige intensiviertere Forschungen zum zeitlichen Ablauf der diabetischen Nephropathie und der Expression von Integrin β 3 essenziell.

Generell zeigen an Diabetes Mellitus erkrankte Patienten eine erhöhte Inzidenz für kardiovaskuläre Ereignisse und arteriosklerotische Veränderungen im Vergleich zur Normalbevölkerung. Betrachtet man den Einfluss des RS 5918 Polymorphismus auf kardiovaskuläre Ereignisse, zeichnet sich jedoch kein eindeutiges Bild ab. Ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus und der Inzidenz der koronaren Herzerkrankung ist Gegenstand mehrerer Studien [99]. Eine Pilotstudie mit univarianter Analyse über die Bedeutung verschiedener Polymorphismen kann eine signifikante Häufung der koronaren Herzerkrankungen bei Trägern des RS 5918 Polymorphismus beobachten [100]. Eine weitere Studie aus dem Jahre 2016 kommt zu einem ähnlichen Ergebnis, nämlich dass das Vorliegen des RS 5918 Polymorphismus die Vulnerabilität für eine koronare Herzerkrankung erhöht [101]. Die bisher größte Metaanalyse von insgesamt 53 Studien kommt zu dem Schluss, dass eine Assoziation des Polymorphismus mit dem Auftreten von Myokardinfarkten bei ausschließlich jungen Patienten vorliegt [102]. Im Gegensatz dazu kann eine größere Studie weder einen Zusammenhang des Polymorphismus mit der Inzidenz eines Diabetes Mellitus noch mit der Inzidenz von kardiovaskulären Erkrankungen zeigen [20]. In einer älteren Metaanalyse von 23 Studien aus dem Jahre 2000 kann ebenfalls keine Assoziation zwischen dem Polymorphismus und dem Myokardinfarktrisiko gefunden werden [103]. Unsere Arbeit zeigt, dass es zu keiner signifikanten Häufung von Myokardinfarkten durch den RS 5918 Polymorphismus bei älteren Patienten (Altersmedian 64 Jahre) kommt. Eine Studie eines älteren Patientenkollektivs (durchschnittliches Alter 70 Jahre), in der die Morphologie von arteriosklerotischen Plaques der Arteria carotis mittels MRT Aufnahmen untersucht wird, zeigt eine Veränderung bei homozygoten Genträgern. Das dort gezeigte höhere Risiko für eine Plaqueruptur entsteht möglicherweise dadurch, dass bei den homozygoten Genträgern die Fibrinkappen der Plaques signifikant dünner sind und der lipidreiche Kern der Plaques

dicker, im Vergleich zur Kontrollgruppe [104]. Neben der erhöhten Gefahr der Plaqueruptur könnte auch eine verstärkte Thrombozytenaggregation für das erhöhte Plaquerupturrisiko verantwortlich sein [105]. Diese gesteigerte Thrombozytenaggregation kann allgemein durch Scherkräfte weiter verstärkt werden [106]. Eine Metaanalyse aus 27 Studien zeigt ein erhöhtes Risiko auf einen ischämischen Apoplex durch den Polymorphismus bei jungen Patienten (< 45 Jahre) [107]. In der hier vorliegenden Arbeit kann kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus und der Inzidenz eines Apoplexes gezeigt werden. Das könnte auch an der vergleichsweise niedrigen Teilnehmerzahl liegen.

Offenbar erhöht der RS 5918 Polymorphismus die Wahrscheinlichkeit für kardiovaskuläre Erkrankungen nur in einem jungen Patientenkollektiv. Ein Erklärungsansatz könnte in den häufigeren Begleiterkrankungen und Risikofaktoren der älteren Patienten liegen. Dadurch ist es denkbar, dass mögliche statistisch schwächere Effekte, hervorgerufen durch den Polymorphismus, in unserer Studie nicht klar identifizierbar sind. Diese klinischen Beobachtungen stehen allerdings konträr zu den Ergebnissen mehrerer experimenteller Arbeiten, die einen protektiven Effekt des Polymorphismus und eine verringerte inflammatorische Reaktion von Makrophagen zeigen.

Unter physiologischen Bedingungen ist zwar die RNA von Integrin $\beta 3$ in humanem Lebergewebe nachweisbar, nicht aber das exprimierte Protein (Abbildung 23). Lediglich spezialisierte hepatische Ito-Zellen können nach einer Aktivierung das Integrin $\beta 3$ Protein exprimieren. In der vorliegenden Arbeit kann eine signifikante Senkung der γ -GT bei Vorliegen von mindestens eines haploiden Allels des RS 5918 Polymorphismus gezeigt werden. Auch bei der Entstehung der Leberfibrose haben Integrine eine pathophysiologische Bedeutung. Nicht nur in den Nieren, sondern auch in der Leber unterstützt der Vitronectinrezeptor die Angiogenese [108]. Eine medikamentöse Blockade des $\alpha v \beta 3$ im Mausmodell mittels Cilengitide resultiert in einer vermehrten Fibrosierung der Leber und einem Anstieg des γ -GT [108]. Cilengitide kann eine milde Leberhypoxie in bestimmten Teilen der Leber durch eine verminderte Angiogenese induzieren, die zu einer Hochregulation von profibrotischen Genen führt. Korrespondierend dazu zeigt eine weitere Studie eine antiproliferative Wirkung von Cilengitide auf hepatische Ito-Zellen [109]. Diese sind elementarer Bestandteil der Pathophysiologie der Leberzirrhose durch ihre extrazelluläre Kollagensynthese [110]. Zusammenfassend könnte gefolgert werden, dass der untersuchte Polymorphismus durch eine konsekutive konstitutionelle Aktivierung des Integrin $\beta 3$ indirekt die Aktivität des $\alpha v \beta 3$ stimuliert. Daraus könnte ein geringeres Risiko auf eine Fibrose resultieren, was die niedrigeren γ -GT Werte bei den RS 5918 Polymorphismusträgern erklären könnte. Spekulativ kann auch eine indirekte Aktivitätsänderung der Ito-Zellen durch den Polymorphismus angenommen werden.

4.3 Quantitative Aktivitätsmessung der stimulierten Makrophagen anhand der Zytokinsekretion und zellbiologischer Einfluss des RS 5918 Polymorphismus auf stimulierte Makrophagen

Neben der Analyse des Effekts des RS 5918 Polymorphismus in Bezug auf klinische Parameter ist auch eine molekularbiologische Untersuchung Teil dieser Arbeit. Dafür werden die kultivierten Makrophagen mit LPS, PMA und Interferon γ stimuliert, um eine inflammatorische Reaktion auszulösen. LPS gilt allgemein als ein sehr starker Stimulus einer inflammatorischen Reaktion, sodass die Sekretion vieler Zytokine nach einer LPS-Stimulation erhöht wird [75]. Damit bestätigt diese Arbeit die führende Literatur mit den signifikanten Änderungen bei IL-2, IL-2 R, IL-6 [111], IL-7, IL-8 [111], IL-12 [112], Interferon α [113], MCP 1, MIP 1 β [114] und Rantes [115]. PMA hat sowohl eine anti-inflammatorische als auch eine pro-inflammatorische Wirkung auf humane Makrophagen. IL-1 RA, IL-2, IL-2 R, IL-6 [116], IL-7, IL-8 [76], IL-12, Interferon α , MIP 1 β , MCP 1 [117] und Rantes werden nach einer PMA Stimulation verstärkt sezerniert.

Wie die aktuelle Literatur und diese Arbeit zeigen, ist die PMA abhängige Zytokinsekretion dabei ausgeprägter im Vergleich zu Interferon γ [116, 117]. Interferon γ führt zu einer starken Sekretion des MIG 1 (Monokine induced by Interferon γ). Damit zeigen die kultivierten Makrophagen das aus der Literatur erwartete Verhalten [118]. Weiterhin wird die Sekretion von Interferon α , MCP 1 [119] und IL-1 RA durch eine Interferon γ Stimulation signifikant erhöht. Unsere Arbeit bestätigt das Ergebnis einer Studie aus dem Jahr 1998, dass eine Interferon γ Stimulation von Makrophagen keinen bis teilweise sogar einen negativen Einfluss auf die Sekretion von MIP 1 α und MIP 1 β hat [114].

Bezogen auf die Zytokinsekretion in Abhängigkeit des Polymorphismus sind die erhobenen Befunde als sehr heterogen zu bezeichnen. Dies mag auf interindividuellen Unterschieden in der primären Zellkultur zurückzuführen sein, wie es bereits von Rey-Giraud et al. demonstriert wurde [74]. Bei einigen Zytokinen kann ein trendhafter Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus und deren Konzentrationen im Zellüberstand beobachtet werden. Die Sekretion von IL-15 wird in einem dominanten Modell, unabhängig vom verwendeten Stimulus, durch den RS 5918 Polymorphismus reduziert. Ähnlich verhält es sich mit dem Interleukin 1 β . Auch hier wird unter einer LPS Stimulation eine Abnahme der gemessenen Konzentration im Zellüberstand im dominanten Modell für das Vorhandensein eines Allels des RS 5918 Polymorphismus deutlich. Eine weitere Betrachtung zeigt eine verstärkte Sekretion bei heterozygoten Patienten unter einer Interferon γ Stimulation im Vergleich mit der Kontrollgruppe, aber auch mit der homozygoten Gruppe. Dieser Befund wie auch die Tatsache, dass in unserer Studie eine geringe Fallzahl studiert wurde, deutet auf zufällige Effekte hin, die womöglich den großen Standardabweichungen bei den Messungen der einzelnen Zytokine geschuldet sind.

Die Datenlage zur Sekretion von MPO aus humanen Makrophagen ist uneinheitlich. Aktuell gibt es in der Literatur verschiedene Auffassungen darüber, ob humane Makrophagen überhaupt in der Lage sind, MPO zu produzieren. Es zählt zwar nicht zu den klassischen Zytokinen, wird aber vor allem durch neutrophile Granulozyten produziert und sezerniert. In Mausmodellen wird gezeigt, dass Makrophagen in arteriosklerotischen Läsionen kein MPO produzieren [64]. Auch zeigt eine Studie, dass humane Makrophagen generell kein MPO produzieren können [120]. Dazu konträr stehen die Ergebnisse dieser Arbeit die eindeutig zeigt, dass humane Makrophagen, die aus Monozyten differenziert werden, in der Lage sind MPO zu sezernieren. Die Datenlage zum Einfluss von LPS auf die Expression von MPO ist ebenfalls inkonsistent. Unsere Arbeit zeigt aber, dass die MPO Konzentration signifikant nach der LPS Stimulation sinkt, obwohl MPO zu den pro-inflammatorischen Enzymen zählt. In einer anderen Studie kann gezeigt werden, dass eine LPS Stimulation die MPO Expression in bovinen neutrophilen Granulozyten nicht beeinflusst [121]. Weitere Studien zeigen eine erhöhte MPO Aktivität nach LPS Stimulation in murinen Myoepithelzellen [122, 123]. In einer Studie an humanen, gesunden Probanden kann eine Aktivitätssteigerung von MPO nach LPS Inhalation detektiert werden [124]. Diese Studien beziehen sich aber nicht spezifisch auf die Sekretion von MPO aus Makrophagen. Unsere Studie zeigt, dass eine Stimulation von kultivierten Makrophagen die MPO Sekretion signifikant reduziert. Eine gesicherte Erklärung für dieses Phänomen existiert nicht.

4.4 Limitationen der Zellkultur und Ergebnisinterpretation

Bei der Auswertung und dem Vergleich der *in vitro* Zellkulturversuche zur Ausdifferenzierung von humanen Makrophagen aus Monozyten gibt es ausgeprägte interindividuelle Unterschiede der Monozytenspender. Diese wirken sich auf die Aktivität der Zellen, die Differenzierung und Stimulation aus. Neben möglichen Einflüssen durch die Dauermedikation der Probanden und durch den aktuellen Gesundheitszustand könnte auch der Schweregrad des zugrundeliegenden Diabetes Mellitus eine Rolle spielen.

Die Mechanismen, wie die Konditionen des Zellspenders, die die primäre Zellkultur beeinflussen können, sind vielfältig. Beispielsweise haben epigenetische Faktoren einen großen Einfluss auf die Differenzierung von Makrophagen [127]. Weiterhin kommt eine Voraktivierung der kultivierten Makrophagen durch bereits ablaufende Entzündungsprozesse in den Monozytenspendern in Frage. Diese Voraktivierung könnte Einfluss auf die Expression des Oberflächenmoleküls CD 14 in bestimmten Geweben haben. Grundlage dafür ist die Anwesenheit von Lipopolysacchariden, die im Sinne eines positiven Feedbackmechanismus, getriggert durch TNF- α und IL-1 β , die Expression von CD 14 verändern [125]. Die genauere Betrachtung dieses Phänomens übersteigt jedoch die Fragestellung der vorliegenden Arbeit.

Grundproblematik bei allen experimentellen Arbeiten ist die Frage, inwieweit *in vitro* Ergebnisse auf *in vivo* Prozesse übertragen werden können und welche Rolle dabei präanalytische und kulturspezifische Faktoren spielen. In diesem Zusammenhang spielt beispielsweise das sogenannte „Aushungern“ der Zellen vor Stimulation eine wichtige Rolle, ferner die Kultivierungsmethode, der Zeitpunkt der Messung und die verwendete Messmethode sowie *in vitro* Störfaktoren. Sie limitieren die Ergebnisinterpretation von *in vitro* Versuchen. Beim standardisiertem „Aushungern“ der Zellen, wie es in dieser Arbeit durchgeführt wurde, werden die Zellen für einen bestimmten Zeitraum in einem Basismedium ohne Zusätze kultiviert, um die Zellzyklen und die Aktivität aller Zellen in einem Versuchsansatz zu synchronisieren. Es ist allerdings bekannt, dass sich dadurch die Aktivität und die Expressionsmuster bestimmter Enzyme und Rezeptoren bei kultivierten humanen Zellen verändern, wie beispielsweise mTOR (mechanistic target of Rapamycin) [126]. Durch die Aktivitätsänderung des mTOR wäre eine veränderte Sekretion von Wachstumsfaktoren denkbar, die die Ergebnisse der Zellkultur beeinflussen. Auch das verwendete Kulturmedium zeigt einen möglichen Einfluss auf die Ergebnisse, da die Zytokinsekretion von Makrophagen, die im serum-freien Medium (X-VIVO 10) kultiviert werden, signifikant höher ist als vergleichbare Zellen im serum-haltigen Medium (RPMI + 10 % FBS) [74]. Die Differenzierung der Makrophagen ist von diversen Stimuli abhängig, wie beispielsweise M-CSF oder GM-CSF. Es liegt also nahe zu vermuten, dass sich die Medien dahingehend unterscheiden, dass sich die Makrophagen durch die GM-CSF Wirkung in M2 Makrophagen differenzieren [128]. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wird, bedingt das Vorhandensein des RS 5918 Polymorphismus eine gesteigerte Sekretion von GM-CSF durch Makrophagen. Daraus könnte ein Unterschied der Differenzierung der Makrophagen von den Trägern des untersuchten Polymorphismus im Vergleich zu den Wildtyp Makrophagen resultieren. Bei der verwendeten Messmethode spielen der genaue Zeitpunkt der Messung der verschiedenen Zytokine und Stimulationszeiträume eine Rolle. Ein zu langer Stimulationszeitraum kann beispielsweise einen toxischen Effekt auf die Zellen haben. Das könnte ein Erklärungsansatz für die reduzierte Proteinkonzentration nach LPS Stimulation sein. Bei der Aktivitätsbestimmung kann ein Unterschied zwischen der Zytokinsekretion, mRNA Expression der codierten Zytokine und der Zytokinproduktion gezeigt werden [129]. Ein Anstieg der mRNA verschiedener Zytokine resultiert dabei nicht obligat in einer Zytokinproduktion [111]. Da unsere Arbeit lediglich die Sekretion untersucht, können keine Aussagen über den Einfluss des RS 5918 Polymorphismus auf die Zytokinproduktion oder mRNA Produktion getroffen werden. Daneben können auch Feedbackmechanismen bei der Quantität der sekretierten Zytokine eine Rolle spielen. Das anti-inflammatorisch wirkende Interleukin 10 wird literaturabhängig mit monoklonalen Antikörpern antagonisiert [130], oder die Wirkung des Interleukin 10 durch eine Antagonisierung des Rezeptors Interleukin 10 R α aufgehoben [131], um eine ausgeprägtere inflammatorische Reaktion der kultivierten Zellen zu provozieren. Besonders ausgeprägt sind dabei die Effekte auf Interleukin 6 und TNF α [132, 133].

Eine weitere Methode zur Auswertung der Daten bestünde darin, die Messwerte, die unterhalb des Messniveaus liegen, mit einer Konzentration von 0 mg/ml zu definieren, um die auszuwertende Datenmenge zu vergrößern und möglicherweise das Signifikanzniveau ($p < 0,05$) zu erreichen. Auch könnten durch eine Vergrößerung des untersuchten Patientenkollektivs signifikante Ergebnisse erzielt werden.

4.5 Aussichten und Zusammenfassung

Zusammenfassend können mit Hilfe der angewendeten molekularbiologischen Methoden keine einheitlichen, relevanten Effekte des RS 5918 Polymorphismus auf die Sekretion von Zytokinen durch humane Makrophagen nachgewiesen werden. In der klinischen Analyse zeigt sich ein trendhafter Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus und der diabetischen Nephropathie sowie pathologischen Veränderungen der Leber, sodass weitere Experimente wünschenswert sind, um diese Ergebnisse molekularbiologisch zu bestätigen.

5. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
<i>4pl Formel</i>	Four-parameter logistic Formel
<i>5pl Formel</i>	Five-parameter logistic Formel
<i>AGE</i>	Advanced glycation endproducts
<i>ALAT</i>	Alanin-Aminotransferase
<i>ASAT</i>	Aspartat-Aminotransferase
<i>BKS</i>	Blutkörperchensenkung
<i>BMI</i>	Body Mass Index
<i>BSA</i>	Bovine Serum Albumin
<i>CCD</i>	Charge-coupled device
<i>CCL</i>	CC Chemokine Ligands
<i>CD</i>	cluster of differentiation
<i>CO₂</i>	Kohlenstoffdioxid
<i>CRP</i>	C-reaktives Protein
<i>CSF</i>	Colony-stimulating factor
<i>Dil</i>	1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylin docarbocyanine
<i>DM</i>	Diabetes Mellitus
<i>DMEM</i>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<i>DMP</i>	Disease-Management-Programm
<i>DMSO</i>	Dimethylsulfoxid
<i>DNA</i>	Desoxyribonucleinacid
<i>Dys</i>	Diastole
<i>EDTA</i>	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>EGF</i>	Epidermal Growth Factor
<i>ELISA</i>	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<i>EMR 1</i>	EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1
<i>FCS</i>	Fetales Kälberserum
<i>G</i>	Vielfaches der Erdanziehung, Fallbeschleunigung
<i>g</i>	Gramm
<i>γ-GT</i>	γ-Glutamyltransferase
<i>GFR</i>	Glomeruläre Filtrationsrate
<i>GOT</i>	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
<i>GPT</i>	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
<i>h</i>	Stunde
<i>HbA1c</i>	Hämoglobin Typ A 1 (glykoliert) c (Stelle der Glykierung)
<i>HDL</i>	High density lipoprotein
<i>HIV</i>	human immunodeficiency virus
<i>HLA</i>	Human Leukocyte Antigen
<i>IDO</i>	Indolamin 2,3-dioxygenase
<i>IFN</i>	Interferon
<i>Ig</i>	Immunglobulin
<i>IGF</i>	Impaired glucose fasting
<i>IGT</i>	Impaired glucose tolerance
<i>IL</i>	Interleukin
<i>IQR</i>	interquartile range
<i>KHK</i>	Koronare Herzerkrankung
<i>l</i>	Liter
<i>LADA</i>	Latent autoimmune diabetes in adults
<i>LBP</i>	Lipopolysaccharid binding protein
<i>LDL</i>	Low density Lipoprotein
<i>Leu</i>	Leucin

<i>LPS</i>	Lipopolysaccharid
<i>LSD</i>	Least significant difference
<i>LURIC</i>	Ludwigshafen Cardiovascular Risk in Community study
<i>M</i>	Molar
<i>MCP-1</i>	Monocyte chemoattractant protein 1
<i>M-CSF</i>	Macrophage colony-stimulating factor
<i>MFI</i>	Mean fluorescence intensity
<i>MHC</i>	Major Histocompatibility Complex
<i>MIG</i>	Monokine-induced by Interferon- γ
<i>min</i>	Minute
<i>MIP</i>	Macrophage inflammatory protein
<i>MODY</i>	Maturity-Onset Diabetes of the Young
<i>MPO</i>	Myeloperoxidase
<i>mRNA</i>	Messenger-ribonucleinacid
<i>mTOR</i>	Mechanistic Target of Rapamycin
<i>NK-Zelle</i>	Natürliche Killerzelle
<i>NSAR</i>	Nicht steroidale Antirheumatika
<i>oGTT</i>	Oraler Glukosetoleranztest
<i>Ox</i>	Oxidized Proteins
<i>PAF</i>	Plättchenaktivierender Faktor
<i>pAVK</i>	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
<i>PBS</i>	Phosphate buffered saline
<i>PCR</i>	Polymerase chain reaction
<i>PMA</i>	Phorbol-12-myristat-13-acetat
<i>Pro</i>	Prolin
<i>Puffer AE</i>	Eluierungspuffer
<i>R</i>	Rezeptor
<i>RA</i>	Rezeptor Antagonist
<i>RAAS</i>	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
<i>RANTES</i>	regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
<i>RIPA</i>	Radioimmunoprecipitation assay
<i>RPE</i>	R-Phycoerythrin
<i>RR</i>	Riva-Rocci (Messmethode zur Blutdruckbestimmung)
<i>RT</i>	Raumtemperatur
<i>s</i>	Sekunde
<i>SD</i>	standard deviation
<i>SNP</i>	single nucleotide polymorphisms
<i>Sys</i>	Systole
<i>TLR</i>	Toll-like Rezeptor
<i>TMB</i>	Tetramethylbenzidin
<i>TNF</i>	Tumor Nekrose Faktor
<i>TVT</i>	Tiefe Beinvenenthrombose
<i>U</i>	Umdrehungen
<i>VEGFR-2</i>	Vascular endothelial growth factor receptor 2
<i>VLDL</i>	Very low density lipoprotein

6. Literatur

1. Abram CL, Lowell CA (2009) The ins and outs of leukocyte integrin signaling. *Annu Rev Immunol* 27:339–362. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132554
2. Hynes RO (1987) Integrins: A Family of Cell Surface Receptors. *Cell* 48:549–554
3. Shattil SJ, Kim C, Ginsberg MH (2010) The final steps of integrin activation. The end game. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(4):288–300. doi:10.1038/nrm2871
4. Bennett JS (2005) Structure and function of the platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. *J Clin Invest* 115(12):3363–3369. doi:10.1172/JCI26989
5. Shpilberg O, Rabi I, Schiller K, Walden R, Harats D, Tyrrell KS, Coller B, Seligsohn U (2002) Patients With Glanzmann Thrombasthenia Lacking Platelet Glycoprotein $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (GPIIb/IIIa) and $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ Receptors Are Not Protected From Atherosclerosis. *Circulation* 105(9):1044–1048. doi:10.1161/hc0902.104676
6. Somanath PR, Malinin NL, Byzova TV (2009) Cooperation between integrin $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ and VEGFR2 in angiogenesis. *Angiogenesis* 12(2):177–185. doi:10.1007/s10456-009-9141-9
7. Patsenker E, Popov Y, Stickel F, Schneider V, Ledermann M, Sägesser H, Niedobitek G, Goodman SL, Schuppan D (2009) Pharmacological inhibition of integrin $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ aggravates experimental liver fibrosis and suppresses hepatic angiogenesis. *Hepatology* 50(5):1501–1511. doi:10.1002/hep.23144
8. Rodan SB, Rodan GA (1997) Integrin function in osteoclasts. *Journal of Endocrinology* 154:47–56
9. Faccio R, Novack DV, Zallone A, Ross FP, Teitelbaum SL (2003) Dynamic changes in the osteoclast cytoskeleton in response to growth factors and cell attachment are controlled by β3 integrin. *J Cell Biol* 162(3):499–509. doi:10.1083/jcb.200212082
10. Tschöepe D, Roesen P, Esser J, Schwippert B, Nieuwenhuis HK, Kehrel B, Gries FA (1991) Large Platelets Circulate in an Activated State in Diabetes Mellitus. *SEMINARS IN THROMBOSIS AND HEMOSTASIS* 17(4)
11. Sato T, Nakai T, Tamura N, Okamoto S, Matsuoka K, Sakuraba A, Fukushima T, Uede T, Hibi T (2005) Osteopontin/Eta-1 upregulated in Crohn's disease regulates the Th1 immune response. *Gut journal* 54(9):1254–1262. doi:10.1136/gut.2004.048298
12. Schneider JG, Zhu Y, Coleman T, Semenkovich CF (2007) Macrophage β3 integrin suppresses hyperlipidemia-induced inflammation by modulating TNF α expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(12):2699–2706. doi:10.1161/ATVBAHA.107.153650
13. Mikkelsen J, Perola M, Laippala P, Penttilä A, Karhunen PJ (2000) Glycoprotein IIIa PIA1/A2 polymorphism and sudden cardiac death. *J Am Coll Cardiol* 36(4):1317–1323. doi:10.1016/s0735-1097(00)00871-8
14. Jallu V, Poulain P, Fuchs PFJ, Kaplan C, Brevern AG de (2012) Modeling and molecular dynamics of HPA-1a and -1b polymorphisms. Effects on the structure of the β3 subunit of the $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ integrin. *PLoS ONE* 7(11):e47304. doi:10.1371/journal.pone.0047304
15. Dohn MR, Kooker CG, Bastarache L, Jessen T, Rinaldi C, Varney S, Mazalouskas MD, Pan H, Oliver KH, Velez Edwards DR, Sutcliffe JS, Denny JC, Carneiro AMD (2017) The Gain-of-Function Integrin β3 Pro33 Variant Alters the Serotonin System in the Mouse Brain. *J Neurosci* 37(46):11271–11284. doi:10.1523/JNEUROSCI.1482-17.2017
16. Oliver KH, Jessen T, Crawford EL, Chung CY, Sutcliffe JS, Carneiro AM (2014) Pro32Pro33 mutations in the integrin β3 PSI domain result in $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ priming and enhanced adhesion. Reversal of the hypercoagulability phenotype by the Src inhibitor SKI-606. *Mol Pharmacol* 85(6):921–931. doi:10.1124/mol.114.091736
17. Tschöepe D, Menart B, Ferber P, Altmann C, Haude M, Haastert B, Roesen P (2003) Genetic variation of the platelet- surface integrin GPIIb-IIIa (PIA1/A2-SNP) shows a high association with Type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 46(7):984–989. doi:10.1007/s00125-003-1132-6

18. Stratmann B, Xu T, Meisinger C, Menart B, Roden M, Herder C, Grallert H, Peters A, Koenig W, Illig T, Wichmann H-E, Wang-Sattler R, Rathmann W, Tschoepe D (2014) PLA1A2 platelet polymorphism predicts mortality in prediabetic subjects of the population based KORA S4-Cohort. *Cardiovasc Diabetol* 13:90. doi:10.1186/1475-2840-13-90
19. Kozieradzka A, Kamiński K, Pepiński W, Janica J, Korecki J, Szepietowska B, Musiał WJ (2007) The association between type 2 diabetes mellitus and A1/A2 polymorphism of glycoprotein IIIa gene. *Acta Diabetol* 44(1):30–33. doi:10.1007/s00592-007-0238-6
20. März W, Boehm BO, Winkelmann BR, Hoffmann MM (2004) The PIA1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa is not associated with the risk of type 2 diabetes. The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study. *Diabetologia* 47(11):1969–1973. doi:10.1007/s00125-004-1557-6
21. Bundesärztekammer, Kassenärztliche Bundesvereinigung, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (2014) Nationale VersorgungsLeitlinie Therapie des Typ-2-Diabetes. Kurzfassung, 1. Aufl
22. Renz-Polster H, Krautzig S, Bätge B, Stoll M (Hrsg) (2013) Basislehrbuch Innere Medizin. Kompakt - greifbar - verständlich ;, 5. Aufl. Elsevier Urban & Fischer, München
23. Ludvigsson J, Samuelsson U, Beauforts C, Deschamps I, Dorchy H, Drash A, Francois R, Herz G, New M, Schober E (1986) HLA-DR 3 is associated with a more slowly progressive form of Type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 29(4):207–210. doi:10.1007/BF00454876
24. Erlich H, Valdes AM, Noble J, Carlson JA, Varney M, Concannon P, Mychaleckyj JC, Todd JA, Bonella P, Fear AL, Lavant E, Louey A, Moonsamy P (2008) HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk. Analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. *Diabetes* 57(4):1084–1092. doi:10.2337/db07-1331
25. Zhao W, Rasheed A, Tikkanen E et al (2017) Identification of new susceptibility loci for type 2 diabetes and shared etiological pathways with coronary heart disease. *Nat Genet* 49(10):1450–1457. doi:10.1038/ng.3943
26. Waldhäusl W-K, Gries FA, Scherbaum WA (Hrsg) (2014) Diabetes in der Praxis, 3. Aufl. Springer Berlin, Berlin
27. Pott G (2007) Das metabolische Syndrom. Übergewicht, Bluthochdruck, Diabetes mellitus mit den Folgen Herzinfarkt und Schlaganfall, 1. Aufl. Kardio Vascular. Schattauer GmbH Verlag für Medizin und Naturwissenschaften, s.l.
28. Herold G (2018) Innere Medizin 2019. Eine vorlesungsorientierte Darstellung : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung : mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Herold Gerd, Köln
29. Yang X, Li Y, Li Y, Ren X, Zhang X, Hu D, Gao Y, Xing Y, Shang H (2017) Oxidative Stress-Mediated Atherosclerosis. Mechanisms and Therapies. *Front Physiol* 8:600. doi:10.3389/fphys.2017.00600
30. Williams KJ, Tabas I (1995) The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15(5):551–561. doi:10.1161/01.atv.15.5.551
31. Debus ES, Torsello G, Schmitz-Rixen T, Flessenkämper I, Storck M, Wenk H, Grundmann RT (2013) Ursachen und Risikofaktoren der Arteriosklerose. *Gefässchirurgie* 18(6):544–550. doi:10.1007/s00772-013-1233-6
32. Merched A, Tollefson K, Chan L (2010) Beta2 integrins modulate the initiation and progression of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Cardiovasc Res* 85(4):853–863. doi:10.1093/cvr/cvp347
33. Shih PT, Elices MJ, Fang ZT, Ugarova TP, Strahl D, Territo MC, Frank JS, Kovach NL, Cabanas C, Berliner JA, Vora DK (1999) Minimally modified low-density lipoprotein induces monocyte adhesion to endothelial connecting segment-1 by activating beta1 integrin. *J Clin Invest* 103(5):613–625. doi:10.1172/JCI5710.
34. Cetin C, Baumgartner I (2004) Die periphere arterielle Verschlusskrankheit (PAVK). *Curriculum. Schweiz Med Forum* 4:216–223

35. Zellweger MJ (2006) Prognostic significance of silent coronary artery disease in type 2 diabetes. *Herz* 31(3):240–245. doi:10.1007/s00059-006-2790-1
36. Murcia AM, Hennekens CH, Lamas GA, Jiménez-Navarro M, Rouleau JL, Flaker GC, Goldman S, Skali H, Braunwald E, Pfeffer MA (2004) Impact of diabetes on mortality in patients with myocardial infarction and left ventricular dysfunction. *Arch Intern Med* 164(20):2273–2279. doi:10.1001/archinte.164.20.2273
37. Molz E, Risse A, Welp-Overmann U, Jockenhoevel F, Bollen M, Badenhop K, Holl RW (2012) Herzinfarkt- und Schlaganfallrisiko bei 102.339 DM-Typ-2-Patienten der Diabetes-Patienten-Verlaufsdokumentation (DPV). Wer ist gefährdet? *Diabetologie und Stoffwechsel* 7(S 01). doi:10.1055/s-0032-1314484
38. Jousseaume AM, Fauser S, Krohne TU, Lemmen K-D, Lang GE, Kirchhof B (2003) Diabetische Retinopathie. Pathophysiologie und Therapie einer hypoxieinduzierten Entzündung. *Ophthalmologie* 100(5):363–370. doi:10.1007/s00347-003-0800-8
39. Lim AK (2014) Diabetic nephropathy - complications and treatment. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 7:361–381. doi:10.2147/IJNRD.S40172
40. Bansal V, Kalita J, Misra UK (2006) Diabetic neuropathy. *Postgrad Med J* 82(964):95–100. doi:10.1136/pgmj.2005.036137
41. Schmidt AM (2018) Highlighting Diabetes Mellitus. The Epidemic Continues. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 38(1):e1–e8. doi:10.1161/ATVBAHA.117.310221
42. Tuttolomondo A, Maida C, Pinto A (2015) Diabetic foot syndrome. Immune-inflammatory features as possible cardiovascular markers in diabetes. *World J Orthop* 6(1):62–76. doi:10.5312/wjo.v6.i1.62
43. Jeffcoate W (2008) The causes of the Charcot syndrome. *Clin Podiatr Med Surg* 25(1):29–42, vi. doi:10.1016/j.cpm.2007.10.003.
44. Galderisi M (2006) Diastolic dysfunction and diabetic cardiomyopathy. Evaluation by Doppler echocardiography. *J Am Coll Cardiol* 48(8):1548–1551. doi:10.1016/j.jacc.2006.07.033
45. Yang J, Zhang L, Yu C, Yang X-F, Wang H (2014) Monocyte and macrophage differentiation. Circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res* 2(1):1. doi:10.1186/2050-7771-2-1
46. Verreck FAW, Boer T de, Langenberg DML, van der Zanden L, Ottenhoff THM (2006) Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation. *J Leukoc Biol* 79(2):285–293. doi:10.1189/jlb.0105015
47. Röszer T (2015) Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm* 2015:816460. doi:10.1155/2015/816460
48. Schütt C, Bröker B (2009) *Grundwissen Immunologie*, 2. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
49. Swanson JA, Hoppe AD (2004) The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol* 76(6):1093–1103. doi:10.1189/jlb.0804439
50. Victor VM, Rocha M, Solá E, Bañuls C, Garcia-Malpartida K, Hernández-Mijares A (2009) Oxidative stress, endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Curr Pharm Des* 15(26):2988–3002. doi:10.2174/138161209789058093
51. Kelley SL, Lukk T, Nair SK, Tapping RI (2013) The crystal structure of human soluble CD14 reveals a bent solenoid with a hydrophobic amino-terminal pocket. *J Immunol* 190(3):1304–1311. doi:10.4049/jimmunol.1202446
52. Loppnow H (2001) Zytokine: Klassifikation, Rezeptoren, Wirkungsmechanismen. *Internist* 42:13–27
53. Robinson CM, O'Dee D, Hamilton T, Nau GJ (2010) Cytokines involved in interferon-gamma production by human macrophages. *J Innate Immun* 2(1):56–65. doi:10.1159/000247156
54. I.C. Kowanko AF (1987) Stimulation of neutrophil respiratory burst and lysosomal enzyme release by human interferon-gamma. *Immunology* (62):149–151

55. Meng F, Lowell CA (1997) Lipopolysaccharide (LPS)-induced Macrophage Activation and Signal Transduction in the Absence of Src-Family Kinases Hck, Fgr, and Lyn. *Journal of Experimental Medicine* 185(9):1661–1670
56. Beaty CD, Franklin TL, Uehara Y, Wilson CB (1994) Lipopolysaccharide-induced cytokine production in human monocytes: role of tyrosine phosphorylation in transmembrane signal transduction. *European journal of Immunology* 24:1278–1284
57. Ryan KA, Smith MF, Sanders MK, Ernst PB (2004) Reactive oxygen and nitrogen species differentially regulate Toll-like receptor 4-mediated activation of NF-kappa B and interleukin-8 expression. *Infection and Immunity* 72(4):2123–2130. doi:10.1128/IAI.72.4.2123-2130.2004
58. Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y. (1982) Direct Activation of Calcium-activated, Phospholipid-dependent Protein Kinase by Tumor-promoting Phorbol Esters. *The Journal of Biological Chemistry* 257(13):7847–7851
59. Niedel JE, Kuhn LJ, Vandenberg GR (1983) Phorbol diester receptor copurifies with protein kinase C. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80(1):36–40. doi:10.1073/pnas.80.1.36
60. Breckwoldt M (2010) Visualisierung des Enzyms Myeloperoxidase in den Mausmodellen der Multiplen Sklerose und Cerebralen Ischämie mithilfe der Magnet Resonanz Tomographie und dem experimentellen Kontrastmittel bis-5HT-Gd-DTPA. *Promotionsschrift*
61. Nauseef WM (2014) Myeloperoxidase in human neutrophil host defence. *Cell Microbiol* 16(8):1146–1155. doi:10.1111/cmi.12312
62. Hoy A, Leininger-Muller B, Kutter D, Siest G, Visvikis S (2002) Growing significance of myeloperoxidase in non-infectious diseases. *Clin Chem Lab Med* 40(1):2–8. doi:10.1515/CCLM.2002.002
63. Daugherty A, Dunn JL, Rateri DL, Heinecke JW (1994) Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 94(1):437–444. doi:10.1172/JCI117342
64. McMillen TS, Heinecke JW, LeBoeuf RC (2005) Expression of human myeloperoxidase by macrophages promotes atherosclerosis in mice. *Circulation* 111(21):2798–2804. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.516278
65. Wiersma JJ, Meuwese MC, van Miert JN, Kastelein A, Tijssen JGP, Piek JJ, Trip MD (2008) Diabetes mellitus type 2 is associated with higher levels of myeloperoxidase. *Med Sci Monit* 14(8):406–410
66. Pourfarzam M, Movahedian A, Sarrafzadegan N, Basati G, Samsamshariat SZ (2013) Association between Plasma Myeloperoxidase and Free 3-Nitrotyrosine Levels in Patients with Coronary Artery Disease. *IJCM* 4(3):158–164. doi:10.4236/ijcm.2013.43028
67. Gómez García A, Rivera Rodríguez M, Gómez Alonso C, Rodríguez Ochoa DY, Alvarez Aguilar C (2015) Myeloperoxidase is associated with insulin resistance and inflammation in overweight subjects with first-degree relatives with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab J* 39(1):59–65. doi:10.4093/dmj.2015.39.1.59
68. Heinecke JW, Goldberg IJ (2014) Myeloperoxidase. A therapeutic target for preventing insulin resistance and the metabolic sequelae of obesity? *Diabetes* 63(12):4001–4003. doi:10.2337/db14-1273
69. Peqlab Biotechnologie GmbH (2011) NanoDrop 1000 Spectrophotometer User's Manual. V3.8
70. Pacheco MP, John E, Kaoma T, Heinäniemi M, Nicot N, Vallar L, Bueb J-L, Sinkkonen L, Sauter T (2015) Integrated metabolic modelling reveals cell-type specific epigenetic control points of the macrophage metabolic network. *BMC Genomics* 16:809. doi:10.1186/s12864-015-1984-4
71. Vogt G, Nathan C (2011) In vitro differentiation of human macrophages with enhanced antimycobacterial activity. *J Clin Invest* 121(10):3889–3901. doi:10.1172/JCI57235
72. Chapman HA, Stone OL (1984) Comparison of live human neutrophil and alveolar macrophage elastolytic activity in vitro. Relative resistance of macrophage elastolytic activity to serum and alveolar proteinase inhibitors. *J Clin Invest* 74(5):1693–1700. doi:10.1172/JCI111586.

73. Ma H, Croudace JE, Lammas DA, May RC (2006) Expulsion of live pathogenic yeast by macrophages. *Curr Biol* 16(21):2156–2160. doi:10.1016/j.cub.2006.09.032
74. Rey-Giraud F, Hafner M, Ries CH (2012) In vitro generation of monocyte-derived macrophages under serum-free conditions improves their tumor promoting functions. *PLoS ONE* 7(8):e42656. doi:10.1371/journal.pone.0042656
75. Rossol M, Heine H, Meusch U, Quandt D, Klein C, Sweet MJ, Hauschildt S (2011) LPS-induced Cytokine Production in Human Monocytes and Macrophages. *Crit Rev Immunol* 31(5):379–446. doi:10.1615/CritRevImmunol.v31.i5.20
76. Baqui AAMA, Meiller TF, Falkler WA (1999) Enhanced interleukin-8 production in THP-1 human monocytic cells by lipopolysaccharide from oral microorganisms and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Oral Microbiol Immunol* 14(5):275–280. doi:10.1034/j.1399-302X.1999.140502.x
77. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193(1):265–275
78. Gressner AM, Arndt T (2019) *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, 3. Aufl. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*
79. Dinarello CA (2007) Historical insights into cytokines. *European journal of Immunology* 37 Suppl 1:S34-45. doi:10.1002/eji.200737772
80. Zlatko Dembic (2015) *The Cytokines of the Immune System. The Role of Cytokines in Disease Related to Immune Response*. Elsevier
81. Rodriguez S, Gaunt TR, Day INM (2009) Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. *Am J Epidemiol* 169(4):505–514. doi:10.1093/aje/kwn359
82. Goncharova IA, Babushkina NP, Minaycheva LI, Markova VV, Kulish EV, Salakhov RR, Makeeva OA, Puzyrev VP (2013) Prevalence of alleles of polymorphic variants Leu33Pro and Leu66Arg gene ITGB3 among inhabitants of Siberia. *Russ J Genet* 49(8):877–880. doi:10.1134/S1022795413070053
83. Lim J, Lal S, Ng KC, Ng K-S, Saha N, Heng C-K (2003) Variation of the platelet glycoprotein IIIa PIA1/A2 allele frequencies in the three ethnic groups of Singapore. *International Journal of Cardiology* 90(2-3):269–273. doi:10.1016/S0167-5273(02)00567-3
84. Pozzi A, Zent R (2013) Integrins in kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 24(7):1034–1039. doi:10.1681/ASN.2013010012
85. Jin DK, Fish A, Wayner E, Mauer M, Setty S, Tsilibar E, Kim Y (1996) Distribution of integrin subunits in human diabetic kidneys. *Journal of the American Society of Nephrology* 7:2636–2645
86. Staeck O, Slowinski T, Lieker I, Wu K, Rudolph B, Schmidt D, Brakemeier S, Neumayer H-H, Wei C, Reiser J, Budde K, Halleck F, Khadzhynov D (2015) Recurrent Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis Managed With Intensified Plasma Exchange and Concomitant Monitoring of Soluble Urokinase-Type Plasminogen Activator Receptor-Mediated Podocyte β 3-integrin Activation. *Transplantation* 99(12):2593–2597. doi:10.1097/TP.0000000000000914
87. Santulli G, Basilicata MF, Simone M de, Del Giudice C, Anastasio A, Sorriento D, Saviano M, Del Gatto A, Trimarco B, Pedone C, Zaccaro L, Iaccarino G (2011) Evaluation of the anti-angiogenic properties of the new selective α V β 3 integrin antagonist RGDechiHCit. *J Transl Med* 9:7. doi:10.1186/1479-5876-9-7
88. Madhusudhan T, Ghosh S, Wang H, Dong W, Gupta D, Elwakiel A, Stoyanov S, Al-Dabet M'dM, Krishnan S, Biemann R, Nazir S, Zimmermann S, Mathew A, Gadi I, Rana R, Zeng-Brouwers J, Moeller MJ, Schaefer L, Esmon CT, Kohli S, Reiser J, Rezaie AR, Ruf W, Isermann B (2020) Podocyte Integrin- β 3 and Activated Protein C Coordinately Restrict RhoA Signaling and Ameliorate Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 31(8):1762–1780. doi:10.1681/ASN.2019111163
89. Soldi R, Mitola S, Strasly M, Defilippi P, Tarone G, Bussolino F (1999) Role of α V β 3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *The EMBO Journal* 18(4):882–892

90. Li R, Ren M, Chen N, Luo M, Zhang Z, Wu J (2012) Vitronectin increases vascular permeability by promoting VE-cadherin internalization at cell junctions. *PLoS ONE* 7(5):e37195. doi:10.1371/journal.pone.0037195
91. Reiser J, Sever S (2013) Podocyte biology and pathogenesis of kidney disease. *Annu Rev Med* 64:357–366. doi:10.1146/annurev-med-050311-163340
92. Maile LA, Gollahon K, Wai C, Dunbar P, Busby W, Clemmons D (2014) Blocking $\alpha V\beta 3$ integrin ligand occupancy inhibits the progression of albuminuria in diabetic rats. *J Diabetes Res* 2014(ID 421827). doi:10.1155/2014/421827
93. Zhou X, Zhang J, Haimbach R, Zhu W, Mayer-Ezell R, Garcia-Calvo M, Smith E, Price O, Kan Y, Zycband E, Zhu Y, Hoek M, Cox JM, Ma L, Kelley DE, Pinto S (2017) An integrin antagonist (MK-0429) decreases proteinuria and renal fibrosis in the ZSF1 rat diabetic nephropathy model. *Pharmacol Res Perspect* 5(5). doi:10.1002/prp2.354
94. Reinholt FP, Hulthén K, Oldberg A, Heinegård D (1990) Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87(12):4473–4475. doi:10.1073/pnas.87.12.4473
95. Nicholas SB, Liu J, Kim J, Ren Y, Collins AR, Nguyen L, Hsueh WA (2010) Critical role for osteopontin in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 77(7):588–600. doi:10.1038/ki.2009.518
96. Schnittert J, Bansal R, Storm G, Prakash J (2018) Integrins in wound healing, fibrosis and tumor stroma. High potential targets for therapeutics and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 129:37–53. doi:10.1016/j.addr.2018.01.020
97. Antonov AS, Antonova GN, Munn DH, Mivechi N, Lucas R, Catravas JD, Verin AD (2011) $\alpha V\beta 3$ integrin regulates macrophage inflammatory responses via PI3 kinase/Akt-dependent NF- κB activation. *J Cell Physiol* 226(2):469–476. doi:10.1002/jcp.22356
98. Grutzmacher C, Park S, Zhao Y, Morrison ME, Sheibani N, Sorenson CM (2013) Aberrant production of extracellular matrix proteins and dysfunction in kidney endothelial cells with a short duration of diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol* 304(1):F19-30. doi:10.1152/ajprenal.00036.2012
99. Weiss Ethan J., Bray Paul F., Tayback Matthew, Schulman Steven P., Kickler Thomas S., Becker Lewis C., Weiss James L., Gerstenblith Gary, Goldschmidt-Clermont Pascal J. (1996) A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *The new England Journal of Medicine* 334(17):1091–1094. doi:10.1016/S0887-7963(96)80015-0
100. Fawzy MS, Toraih EA, Aly NM, Fakhr-Eldeen A, Badran DI, Hussein MH (2017) Atherosclerotic and thrombotic genetic and environmental determinants in Egyptian coronary artery disease patients. A pilot study. *BMC Cardiovasc Disord* 17(1):26. doi:10.1186/s12872-016-0456-3
101. Khatami M, Heidari MM, Soheilyfar S (2016) Common rs5918 (PIA1/A2) polymorphism in the ITGB3 gene and risk of coronary artery disease. *Arch Med Sci Atheroscler Dis* 1(1):e9-e15. doi:10.5114/amsad.2016.59587
102. Floyd CN, Mustafa A, Ferro A (2014) The PIA1/A2 polymorphism of glycoprotein IIIa as a risk factor for myocardial infarction. A meta-analysis. *PLoS ONE* 9(7):e101518. doi:10.1371/journal.pone.0101518
103. Zhu MM, Weedon J, Clark LT (2000) Meta-analysis of the association of platelet glycoprotein IIIa PIA1/A2 polymorphism with myocardial infarction. *The American Journal of Cardiology* 86(9):1000–1005. doi:10.1016/S0002-9149(00)01136-X
104. Kucharska-Newton AM, Monda KL, Campbell S, Bradshaw PT, Wagenknecht LE, Boerwinkle E, Wasserman BA, Heiss G (2011) Association of the platelet GPIIb/IIIa polymorphism with atherosclerotic plaque morphology. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Atherosclerosis* 216(1):151–156. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.01.038
105. Feng D, Lindpaintner K, Larson M, Rao V, Lipinska I, Schmitz C, Sutherland P, Silbershatz H, Muller J, Myers R, Levy D, Tofler G (1999) Increased Platelet Aggregability Associated With Platelet GPIIIa PIA2 Polymorphism. The Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:1142–1147. doi:10.1161/01.ATV.19.4.1142

106. Vijayan KV, Huang TC, Liu Y, Bernardo A, Dong J-F, Goldschmidt-Clermont PJ, Alevriadou BR, Bray PF (2003) Shear stress augments the enhanced adhesive phenotype of cells expressing the Pro33 isoform of integrin β 3. *FEBS Letters* 540(1-3):41–46. doi:10.1016/S0014-5793(03)00170-4
107. Floyd CN, Ellis BH, Ferro A (2014) The P1A1/A2 polymorphism of glycoprotein IIIa as a risk factor for stroke. A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 9(7):e100239. doi:10.1371/journal.pone.0100239
108. Patsenker E, Popov Y, Stickel F, Schneider V, Ledermann M, Sägesser H, Niedobitek G, Goodman SL, Schuppan D (2009) Pharmacological inhibition of integrin α v β 3 aggravates experimental liver fibrosis and suppresses hepatic angiogenesis. *Hepatology* 50(5):1501–1511. doi:10.1002/hep.23144
109. Patsenker E, Popov Y, Wiesner M, Goodman SL, Schuppan D (2007) Pharmacological inhibition of the vitronectin receptor abrogates PDGF-BB-induced hepatic stellate cell migration and activation in vitro. *J Hepatol* 46(5):878–887. doi:10.1016/j.jhep.2006.11.011
110. Zhou X, Murphy FR, Gehdu N, Zhang J, Iredale JP, Benyon RC (2004) Engagement of α v β 3 integrin regulates proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells. *The Journal of Biological Chemistry* 279(23):23996–24006. doi:10.1074/jbc.M311668200
111. Zhong WW, Burke PA, Hand T, Walsh MJ, Hughes LA (1993) Regulation of Cytokine mRNA-Expression in LPS stimulated human macrophages. *Arch Surg* 128:158–164
112. Bonder CS, Finlay-Jones JJ, Hart PH (1999) Interleukin-4 regulation of human monocyte and macrophage interleukin-10 and interleukin-12 production. Role of a functional interleukin-2 receptor gamma-chain. *Immunology* 96(4):529–536. doi:10.1046/j.1365-2567.1999.00711.x
113. Cantell K, Pirhonen J (1996) IFN- γ Enhances Production of IFN- α in Human Macrophages but Not in Monocytes. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 16:461–463
114. Sherry B, Espinoza M, Manogue KR, Cerami A (1998) Induction of the Chemokine 13 Peptides, MIP-1 α and MIP-1 β , by Lipopolysaccharide Is Differentially Regulated by Immunomodulatory Cytokines γ -IFN, IL-10, IL-4, and TGF- β . *Molecular Medicine* 4:648–657. doi:10.1016/S0094-730X(98)00007-2
115. Lebovic DI, Chao VA, Taylor RN (2004) Peritoneal macrophages induce RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) chemokine gene transcription in endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 89(3):1397–1401. doi:10.1210/jc.2003-031010
116. Meier CA, Chicheportiche R, Juge-Aubry CE, Dreyer MG, Dayer J-M (2002) Regulation of the Interleukin-1 receptor antagonist THP-1 cells by ligands of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Cytokine* 18(6):320–328. doi:10.1006/cyto.2002.1945
117. Schutte RJ, Parisi-Amon A, Reichert WM (2009) Cytokine profiling using monocytes/macrophages cultured on common biomaterials with a range of surface chemistries. *J Biomed Mater Res A* 88(1):128–139. doi:10.1002/jbm.a.31863
118. Farber JM (1990) A macrophage mRNA selectively induced by gamma-interferon encodes a member of the platelet factor 4 family of cytokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87(14):5238–5242. doi:10.1073/pnas.87.14.5238
119. Bauermeister K, Burger M, Almanasreh N, Knopf HP, Schumann RR, Schollmeyer P, Dobos GJ (1998) Distinct regulation of IL-8 and MCP-1 by LPS and interferon-c-treated human peritoneal macrophages. *Nephrology Dialysis Transplantation* 13:1412–1419
120. Amanzada A, Malik IA, Nischwitz M, Sultan S, Naz N, Ramadori G (2011) Myeloperoxidase and elastase are only expressed by neutrophils in normal and in inflamed liver. *Histochem Cell Biol* 135(3):305–315. doi:10.1007/s00418-011-0787-1
121. Revelo XS, Waldron MR (2012) In vitro effects of Escherichia coli lipopolysaccharide on the function and gene expression of neutrophils isolated from the blood of dairy cows. *J Dairy Sci* 95(5):2422–2441. doi:10.3168/jds.2011-4616

122. Xiao H-B, Wang C-R, Liu Z-K, Wang J-Y (2015) LPS induces pro-inflammatory response in mastitis mice and mammary epithelial cells. Possible involvement of NF- κ B signaling and OPN. *Pathol Biol* 63:11–16. doi:10.1016/j.patbio.2014.10.005
123. Haegens A, Heeringa P, van Suylen RJ, Steele C, Aratani Y, O'Donoghue RJJ, Mutsaers SE, Mossman BT, Wouters EFM, Vernooij JHJ (2009) Myeloperoxidase deficiency attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation and subsequent cytokine and chemokine production. *J Immunol* 182(12):7990–7996. doi:10.4049/jimmunol.0800377
124. Maris NA, Vos AF de, Dessing MC, Spek CA, Lutter R, Jansen HM, van der Zee JS, Bresser P, van der Poll T (2005) Anti-inflammatory effects of salmeterol after inhalation of lipopolysaccharide by healthy volunteers. *Am J Respir Crit Care Med* 172(7):878–884. doi:10.1164/rccm.200503-451OC
125. Rivest S, Lacroix S, Vallières L, Nadeau S, Zhang J, Laflamme N (2000) How the Blood Talks to the Brain Parenchyma and the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus During Systemic Inflammatory and Infectious Stimuli. *Proc Soc Exp Biol Med* 223(1):22–38. doi:10.1046/j.1525-1373.2000.22304.x
126. Pirkmajer S, Chibalin AV (2011) Serum starvation. Caveat emptor. *Am J Physiol , Cell Physiol* 301(2):C272-279. doi:10.1152/ajpcell.00091.2011
127. Chen S, Yang J, Wei Y, Wei X (2020) Epigenetic regulation of macrophages. From homeostasis maintenance to host defense. *Cell Mol Immunol* 17(1):36–49. doi:10.1038/s41423-019-0315-0
128. Verreck FAW, Boer T de, Langenberg DML, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E, Kastelein R, Kolk A, Waal-Malefyt R de, Ottenhoff THM (2004) Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(13):4560–4565. doi:10.1073/pnas.0400983101
129. Sousa Abreu R de, Penalva LO, Marcotte EM, Vogel C (2009) Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Mol Biosyst* 5(12):1512–1526. doi:10.1039/b908315d
130. Wagner RD, Maroushek NM, Brown JF, Czuprynski CJ (1994) Treatment with Anti-Interleukin-10 Monoclonal Antibody Enhances Early Resistance to but Impairs Complete Clearance of *Listeria monocytogenes* Infection in Mice. *Infection and Immunity* 62(6):2345–2353
131. Eddie WK, Hoshi N, Shouval DS, Snapper S, Medzhitov R (2017) Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. *Science* 356:513–519. doi:10.1126/science.aal3535
132. Williams L, Bradley L, Smith A, Foxwell B (2004) Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Is the Dominant Mediator of the Anti-Inflammatory Effects of IL-10 in Human Macrophages. *The Journal of Immunology* 172(1):567–576. doi:10.4049/jimmunol.172.1.567
133. Bogdan C (1991) Macrophage deactivation by interleukin 10. *Journal of Experimental Medicine* 174(6):1549–1555. doi:10.1084/jem.174.6.1549

7. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Integrins. α Untereinheit in blau und β Untereinheit in rot. Modifizierte Abbildung aus: Frick, A., Grammel, D., Schmidt, F., Pöschl, J., Priller, M., Pagella, P., Bueren, A.O., Peraud, A., Tonn, J., Herms, J., Rutkowski, S., Kretzschmar, H.A., & Schüller, U. (2012). Proper cerebellar development requires expression of $\beta 1$ -integrin in Bergmann glia, but not in granule neurons. *Glia*, 60 5, 820-32. 1
- Abbildung 2: Schema zur Überprüfung einer Diabetes Diagnose Quelle: Bundesärztekammer, Kassenärztliche Bundesvereinigung, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften Nationale Versorgungs Leitlinie Therapie des Typ-2-Diabetes. Kurzfassung. 1. Auflage, Version. 5
- Abbildung 3: Übersicht über die Blutbildung: Quelle: Amboss GmbH, Salimi, M., Salimi, N., 2017, Neoplasien der Blutzellen Teil 1. 8
- Abbildung 4: Schütt C, Bröker B (2009) Grundwissen Immunologie, 2. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. 9
- Abbildung 5: Schematische Darstellung der Funktionsweise der Signalemission durch das Reportermolekül. Im ersten Schritt lagert sich die Sonde an die DNA an. Anschließend wird die Sonde durch die Taq-Polymerase in Schritt zwei verdrängt und kann somit in Schritt drei ein Signal emittieren, bevor sie in Schritt vier komplett hydrolysiert wird. Quelle: <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/jacob-daniela-2003-07-15/HTML/chapter2.html>. 16
- Abbildung 6: Ergebnis der allelischen Diskriminierung. Auf den Achsen ist die Stärke des Signals aufgetragen (dimensionslose Kennzahl), dass von den Sonden emittiert wird. Auf der x-Achse ist dabei das Signal für Allel eins aufgetragen und korrespondierend dazu auf der y-Achse das Signal für Allel zwei. Die roten Punkte (VIC-Sonde) zeigen das Vorhandensein eines homozygoten Genotyps, die grünen Punkte das Vorhandensein eines heterozygoten Genotyps und die blauen Punkte (FAM-Sonde) das Vorhandensein eines Wildtyps. Die schwarzen Punkte sind Negativkontrollen. 17
- Abbildung 7: Schematische Darstellung der CD 14 Positivselektion mithilfe der magnetischen Partikel. Die CD 14⁺ Zellen werden über Antikörperbindungen magnetisch markiert und haften an den Metallkugeln im Magnetfeld der Säule. Nach drei Waschschrritten werden die markierten CD 14⁺ Zellen von den Metallkugeln durch Herausnehmen aus dem magnetischen Feld und Spülung mittels AE Puffers eluiert. Quelle: MACS Miltenyi Biotec, Select the best brochure (2015), Miltenyi Biotec GmbH, 130-091-618.15. 19
- Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Sandwich ELISA. Der Primärantikörper (grün) am Boden der Mikropipettierplatte ist an das Substrat (rot) gebunden, welches ebenfalls an den Sekundärantikörper (blau) gebunden hat. An diesen Sekundärantikörper ist die Meerrettichperoxidase (E) gekoppelt, die das TMB (Substrat) oxidiert (gelbes Produkt). Quelle: Gute ELISA Praxis Handbuch, (2015), R-Biopharm AG. 24
- Abbildung 9: Schematische Darstellung des Antikörper-Antigen Antikörperkomplexes. Quelle: R&D Systems: Luminex® Assays, (2016), The scientist creative services division. 26
- Abbildung 10: Darstellung der relativen Häufigkeiten der drei Genotypen in einem Kuchendiagramm. 32
- Abbildung 11: Auswirkungen des Genotyps im dominanten Modell auf die γ -GT im Boxplot dargestellt. Zwei Sterne geben ein Signifikanzniveau von $p < 0,01$ an. 36
- Abbildung 12: Auswirkungen des Genotyps im rezessiven Model auf das Kreatinin im Boxplot dargestellt. Ein Stern gibt ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ an. 36
- Abbildung 13: Relative Häufigkeit (x-Achse) einer Nephropathie relativ zu den Genotypen. Genaue Prozentangaben sind in den Balken zu finden. Die blauen Balken zeigen den Prozentsatz an Probanden, die nicht an einer Nephropathie erkrankt sind, die grünen symbolisieren die erkrankten Probanden. 37
- Abbildung 14: Relative prozentuale Verteilung (x-Achse) des Diabetes Typ in den Genotypen. Genaue Prozentangaben sind in den Balken zu finden. Absolute Zahlen sind im weißen Kasten am oberen Rand zu finden. Unter "sonstige" sind alle Diabetestypen inbegriffen, die nicht den Kriterien des Typ 1 oder Typ 2 Diabetes Mellitus entsprechen (lediglich bei der heterozygoten Gruppe). 40
- Abbildung 15: Dargestellt sind representative Bilder der Zellkultivierungsergebnisse an Tag sieben in verschiedenen Zellmedien in 12-Loch Platten. Bild A zeigt Zellen, die in DMEM Medium kultiviert

wurden, Bilder B, C und D zeigen Zellen in RPMI 1640 Medium und Bild E zeigt das Ergebnis, das durch die Verwendung von X-VIVO™ 10 Medium erzielt werden konnte. Die Bilder A – D wurden mit Vergrößerung 400 x und das Bild E wurde mit der Vergrößerung 600 x aufgenommen.

42

Abbildung 16: Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Zellkultivierung in X-VIVO™ 10 Medium mit einem M-CSF [100 ng/ml] Zusatz in 12-Loch Platten. Bild A zeigt die frisch ausgesäten Monozyten. Bild B zeigt Tag zwei, Bild C Tag drei und Bild D Tag fünf. In Bild E ist das Ergebnis der Kultivierung an Tag sieben dargestellt. Die Bilder A – C wurden mit Vergrößerung 400 x und die Bilder D - E mit der Vergrößerung 600 x aufgenommen.

42

Abbildung 17: Immunzytochemischer Nachweis der Differenzierung von Monozyten zu Integrin β 3 +, funktionsfähigen Makrophagen. Das Signal des DAPI Antikörpers zur Darstellung der Zellkerne ist in allen Bildern blau/grau. In der ersten Spalte befindet sich das DAPI Signal, in der zweiten Spalte das jeweils nachzuweisende Antigen und die dritte Spalte zeigt Überlagerungsbilder. Bilder B, C, E und F zeigen den Nachweis von EMR 1. Bilder H und I zeigen durch Inkubation mit 20 μ g/ml Dil-oxLDL eine regelrechte Funktionsweise der Makrophagen. Der Integrin β 3 (grün fluoreszierend) Nachweis zeigt sich in Bilder K und L. Vergrößerung 1000 x.

43

Abbildung 18: Dargestellt sind lichtmikroskopische Aufnahmen von Makrophagen, die in 12-Loch Platten mit verschiedenen Stimuli behandelt wurden. Bild A zeigt dabei die unstimulierte Kontrolle. In Bild B sind Makrophagen abgebildet, die für 8 h mit 100 ng/ml LPS behandelt wurden. Bild C zeigt Makrophagen, die mit 200 nM einer PMA Lösung für 24 h stimuliert wurden und Bild D zeigt die Auswirkungen einer Stimulation mit 50 ng/ml Interferon γ für 24 h. Vergrößerung 600 x.

44

Abbildung 19: Mediane der Proteinkonzentrationen aller Patienten, die für den Stimulus aufgeschlüsselt und im Boxplot dargestellt sind. Drei Sterne geben ein Signifikanzniveau von $p < 0,001$ an.

45

Abbildung 20: MPO Konzentration im Zellüberstand nach verschiedenen Stimuli, ohne Berücksichtigung des Genotyps im Boxplot dargestellt; normalisiert auf Proteinkonzentration; K = Kontrolle.

47

Abbildung 21: Dargestellt sind die Boxplots, auf deren y-Achse die Konzentration des jeweiligen Zytokins mit dazugehörigen Einheiten aufgetragen ist. Auf der x-Achse werden die unterschiedlichen Genotypen dargestellt. Dabei ist jeder einzelne Genotyp in vier Unterkategorien aufgeteilt, deren farbliche Codierung in der Legende zu finden ist. Die blauen Balken zeigen die Kontrollen (K), die grünen Balken LPS, die gelben Balken PMA und die violetten Balken Interferon γ .

49

Abbildung 22: MPO Konzentration im Zellüberstand nach verschiedenen Stimuli, stratifiziert für den Genotyp und in einem Boxplot dargestellt.

52

Abbildung 23: RNA-Expression und Protein-Expression des Integrin beta 3 in verschiedenen humanen Geweben (Quelle: The Human Protein Atlas, RNA and Protein Expression summary, unter <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000259207-ITGB3/tissue>, abgerufen am 21.12.2019 17:08 Uhr).

54

8. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Übersicht über die Folgeerkrankungen des Diabetes Mellitus.</i>	6
<i>Tabelle 2: Klassifikation des Immunsystems nach der humoralen und zellulären Komponente.</i>	8
<i>Tabelle 3: Ablauf der Real-Time PCR mit zugehörigen Temperaturen und Zeitspannen. Schritt 3 und 4 wurden dabei insgesamt 40 Mal wiederholt.</i>	16
<i>Tabelle 4: Sequenz aus dem Integrin β 3 Gen auf Chromosom 17. Der Polymorphismus wurde farblich markiert. Dabei definiert die Base Thymin an Position 1565 den Wildtyp und die Base Cytosin, an der gleichen Position, den Polymorphismus.</i>	16
<i>Tabelle 5: Bestandteile des Master-Mix mit einem Gesamtvolumen von 8 μl.</i>	17
<i>Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Antikörper mit Angabe der Donorspezies, der Verdünnung und der Hersteller Nummer.</i>	21
<i>Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Stimuli. Angegeben sind die Konzentration, Inkubationszeit und die Konzentration der Stocklösung.</i>	22
<i>Tabelle 8: Erklärung der erhobenen Laborparameter.</i>	28
<i>Tabelle 9: Übersicht über die gemessenen Zytokine.</i>	29
<i>Tabelle 10: Übersicht über die verwendeten Chemikalien und deren Hersteller.</i>	30
<i>Tabelle 11: Übersicht über verwendete Geräte und deren Hersteller.</i>	31
<i>Tabelle 12: Übersicht über verwendete Kits und deren Hersteller.</i>	31
<i>Tabelle 13: Hardy-Weinberg Equilibrium. Dargestellt sind die erwarteten und beobachteten absoluten Häufigkeiten der Genotypen.</i>	32
<i>Tabelle 14: Übersicht über die normalverteilten und nichtnormalverteilten Parameter in der Gesamtkohorte. Parameter sind mit der Fallzahl (N), dem Mittelwert und der Standardabweichung (SD) bzw. dem Median und dem Interquartilenabstand (IQR) angegeben.</i>	33
<i>Tabelle 15: Geschlechterverhältnis stratifiziert für den Genotyp.</i>	34
<i>Tabelle 16: Übersicht über die normalverteilten und nichtnormalverteilten Parameter, stratifiziert für den Genotyp. Parameter sind mit dem Mittelwert und der SD bzw. dem Median und dem Interquartilenabstand (IQR) angegeben. Die Maßeinheiten stehen in eckigen Klammern hinter den jeweiligen Parametern. Der IQR ist auf ganze Zahlen gerundet. * Parameter nicht erhoben.</i>	34
<i>Tabelle 17: Übersicht über die Verteilung von Diabetes Mellitus assoziierter Erkrankungen innerhalb der Genotypen. Absolute Anzahl sowie relative Häufigkeit bezogen auf das Gesamtkollektiv sind angegeben. Wichtige Zahlen, auf die im Text näher eingegangen wird, sind markiert.</i>	37
<i>Tabelle 18: Übersichtstabelle über die verwendeten Kulturmedien mit deren Kultivierungsergebnissen. Dabei zeigt „-“ ein schlechtes bzw. „-“-sehr schlechtes Ergebnis und „+“ ein gutes bzw. „++“ sehr gutes Ergebnis an.</i>	41
<i>Tabelle 19: Übersicht über die signifikanten Einflüsse der Stimuli gegenüber der Kontrolle für die einzelnen Zytokine und MPO. \uparrow bedeutet eine gesteigerte Sekretion und \downarrow symbolisiert eine verringerte Sekretion. ¹ Ergebnis ist nicht signifikant, da die Kontrollen unterhalb des Messniveaus lagen; p-Werte sind angegeben.</i>	46

9. Danksagung

Zunächst einmal möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Jochen Schneider danken, dass er mir dieses Thema zur Verfügung gestellt hat und mich tatkräftig in der Planung, Durchführung und Auswertung unterstützt sowie die finanziellen Mittel zur Verfügung gestellt hat. Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Lammert für die Möglichkeit, dass ich in seiner Klinik forschen und arbeiten durfte. Ein besonderer Dank geht an Frau Dr. Ellen Damm für die zeitaufwendige Einarbeitung, die freundliche und äußerst kompetente Unterstützung sowie für die Betreuung. Des Weiteren gilt mein Dank ebenso dem gesamten Forschungsteam der Inneren II an der Universitätsklinik des Saarlandes. Ebenso möchte ich Frau Dr. Fozia Noor für die hervorragende Betreuung danken. Für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung möchte ich mich recht herzlich bei dem Institut für medizinische Biometrie, Epidemiologie und medizinische Informatik an der Universität des Saarlandes bedanken. Bei Frau Ellen Maurer möchte ich mich für die Unterstützung bei der Durchführung der Multiplex-Elisa und bei dem Forschungslabor der Pädiatrie an der Universität des Saarlandes für die Zurverfügungstellung der Messgeräte bedanken.

Ein besonders großer Dank geht hier an Herrn Markus Nenno und Frau Johanna Nenno, die mich herausragend, sowohl privat als auch fachlich unterstützt haben. Dem gesamten Arztpraxisteam Nenno danke ich herzlich für die Unterstützung in der Patientenarbeit.

Auch bei der gesamten Arztpraxis von Herrn Dr. Josef Wenzl und Frau Dr. Veronika Wenzl-Bauer bedanke ich mich herzlich für die tatkräftige, kompetente und freundliche Unterstützung bei der Patientenarbeit und für die Zurverfügungstellung der Räumlichkeiten. Ebenso bei Herrn Dr. Burkhard Giersberg für die sehr freundliche und herzliche Zusammenarbeit sowie bei Frau Dr. Martina Teja.

Natürlich möchte ich an dieser Stelle auch allen Patienten herzlich danken, die sich zur Teilnahme an dieser Studie bereit erklärt haben.

Privat möchte ich mich bei meinen Kommilitonen und guten Freunden für die unvergessliche, lustige und spannende Zeit in Homburg bedanken. Für die sprachliche Überarbeitung dieser Arbeit möchte ich mich sehr bei meinem langjährigen Freund Herrn MSc Stefan Zimmer und meiner ehemaligen Arbeitskollegin Frau Carolin Wiedenbeck bedanken.

Zum Schluss möchte ich meinen liebevollen und großartigen Eltern für alles danken.

- to remove all barriers in the way of science -
--

10. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in
der elektronischen Fassung
der Dissertation nicht veröffentlicht

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in
der elektronischen Fassung
der Dissertation nicht veröffentlicht

11. Appendix I

Die ANOVA sowie der Kruskal-Wallis-Test geben Auskunft darüber, ob ein signifikanter Unterschied zwischen untersuchten Gruppen besteht, nicht aber welche Gruppen sich voneinander signifikant unterscheiden. Bei signifikanten Unterschieden werden diese Ergebnisse mit weiteren Tests spezifiziert. Beim Kruskal-Wallis-Test wird anhand des mittleren Rangs überprüft, ob es einen signifikanten Unterschied zwischen allen untersuchten Gruppen gibt.

Tabelle I: ANOVA für die normalverteilten Parameter. Es sind die Freiheitsgrade (df), der F-Wert (F) und die Signifikanz angegeben. Die Maßeinheiten stehen in eckigen Klammern hinter den jeweiligen Parametern. Bei der ANOVA ergeben sich die Freiheitsgrade zum einen aus der Anzahl der untersuchten Gruppen (Anzahl der Gruppen – eins) und zum anderen aus der Anzahl der Probanden (Anzahl der Probanden – Anzahl untersuchter Gruppen). Die Signifikanz beschreibt, ob der errechnete F-Wert signifikant ist und es somit einen Unterschied zwischen den Gruppen gibt.

<u>Parameter</u>		<u>df</u>	<u>F</u>	<u>Signifikanz</u>
<i>Gesamt-cholesterin [mg/dl]</i>	Zwischen den Gruppen	2	0,260	0,772
	Innerhalb der Gruppen	170		
	Gesamt	172		
<i>LDL [mg/dl]</i>	Zwischen den Gruppen	2	0,570	0,567
	Innerhalb der Gruppen	157		
	Gesamt	159		
<i>GFR [ml/min]</i>	Zwischen den Gruppen	2	3,449	0,034
	Innerhalb der Gruppen	153		
	Gesamt	155		
<i>Neutrophile Granulozyten [%]</i>	Zwischen den Gruppen	2	2,198	0,119
	Innerhalb der Gruppen	64		
	Gesamt	66		
<i>Lymphozyten [%]</i>	Zwischen den Gruppen	2	0,885	0,418
	Innerhalb der Gruppen	64		
	Gesamt	66		

Tabelle II: Kruskal-Wallis-Test bei nichtnormalverteilten Parametern. Aufgetragen sind die Fallzahl (N), der mittlere Rang und die zweiseitige exakte Signifikanz. Die Werte, die einen signifikanten oder trendhaften Zusammenhang zeigen, sind markiert.

<u>Parameter</u>	<u>Genotyp</u>	<u>N</u>	<u>Mittlerer Rang</u>	<u>Signifikanz</u>
<i>Alter</i>	Wildtyp	131	96,47	0,38
	Heterozygot	49	84,48	
	Homozygot	6	102,33	
	Gesamt	186		
<i>Körpergröße [cm]</i>	Wildtyp	130	92,41	0,985
	Heterozygot	47	90,84	
	Homozygot	6	92,25	
	Gesamt	183		
<i>Gewicht [kg]</i>	Wildtyp	129	91,84	0,682
	Heterozygot	47	88,43	
	Homozygot	6	108,17	
	Gesamt	182		
<i>BMI</i>	Wildtyp	129	91,36	0,93
	Heterozygot	47	90,86	
	Homozygot	6	99,5	
	Gesamt	182		
<i>RR SYS [mmHg]</i>	Wildtyp	125	86,07	0,488
	Heterozygot	46	96,52	
	Homozygot	6	92,42	
	Gesamt	177		
<i>RR DYS [mmHg]</i>	Wildtyp	125	87,56	0,84
	Heterozygot	46	92,26	
	Homozygot	6	93,92	
	Gesamt	177		
<i>HbA1c [%]</i>	Wildtyp	131	91,95	0,827
	Heterozygot	49	96,87	
	Homozygot	6	99,75	
	Gesamt	186		
<i>Plasmaglukose [mg/dl]</i>	Wildtyp	49	38,51	0,7
	Heterozygot	22	34,52	
	Homozygot	3	42,83	
	Gesamt	74		
<i>Triglyzeride [mg/dl]</i>	Wildtyp	109	79,02	0,489
	Heterozygot	43	83,44	
	Homozygot	6	59,92	
	Gesamt	158		
<i>HDL [mg/dl]</i>	Wildtyp	112	82,34	0,937
	Heterozygot	44	79,34	
	Homozygot	6	81,58	
	Gesamt	162		
<i>Kreatinin [mg/dl]</i>	Wildtyp	121	88,85	0,112
	Heterozygot	48	81,07	
	Homozygot	6	126,33	
	Gesamt	175		

<i>Harnsäure [mg/dl]</i>	Wildtyp	112	83,25	0,493
	Heterozygot	45	75,47	
	Homozygot	5	96,5	
	Gesamt	162		
<i>Eosinophile Granulozyten [%]</i>	Wildtyp	50	34,95	0,743
	Heterozygot	15	30,6	
	Homozygot	2	35,75	
	Gesamt	67		
<i>Basophile Granulozyten [%]</i>	Wildtyp	50	34,62	0,367
	Heterozygot	15	29,9	
	Homozygot	2	49,25	
	Gesamt	67		
<i>Monozyten [%]</i>	Wildtyp	50	34,54	0,312
	Heterozygot	15	29,87	
	Homozygot	2	51,5	
	Gesamt	67		
<i>Lymphozyten [%]</i>	Wildtyp	50	36,14	0,292
	Heterozygot	15	27,2	
	Homozygot	2	31,5	
	Gesamt	67		
<i>Sonstige Leukozyten [%]</i>	Wildtyp	43	30,7	0,821
	Heterozygot	15	30	
	Homozygot	2	30	
	Gesamt	60		
<i>GPT [U/l]</i>	Wildtyp	70	53,68	0,454
	Heterozygot	33	53,18	
	Homozygot	2	26,25	
	Gesamt	105		
<i>GOT [U/l]</i>	Wildtyp	38	25,01	0,99
	Heterozygot	11	24,95	
	Gesamt	49		
<i>γ-GT [U/l]</i>	Wildtyp	99	78,03	0,027
	Heterozygot	39	56,96	
	Homozygot	5	69,9	
	Gesamt	143		
<i>CRP [mg/l]</i>	Wildtyp	51	40,81	0,26
	Heterozygot	23	31,87	
	Homozygot	1	35,5	
	Gesamt	75		
<i>BKS [mm/h]</i>	Wildtyp	13	10,04	0,965
	Heterozygot	6	9,92	
	Gesamt	19		

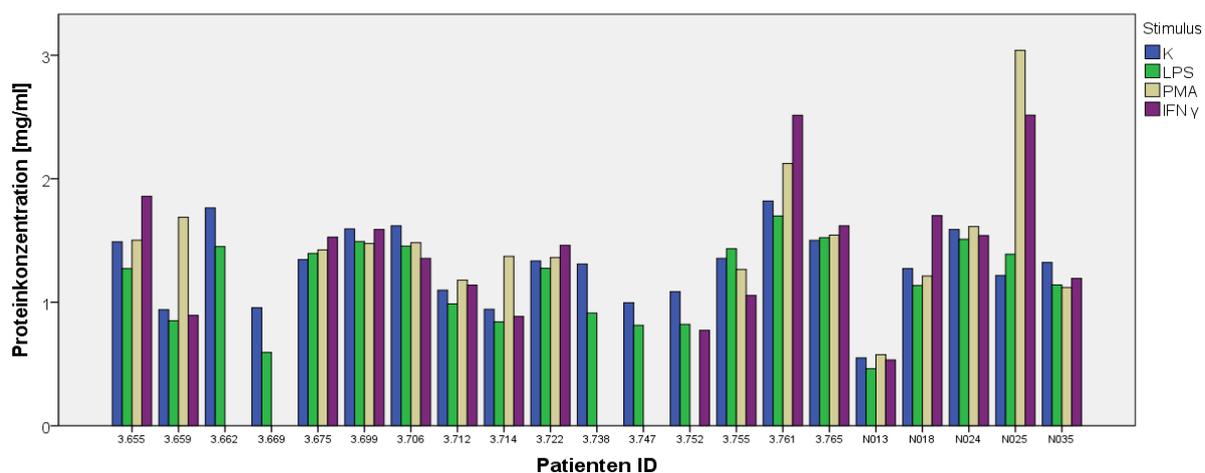


Abbildung I: Proteinkonzentration [mg/ml] für jeden Ansatz. Auf der x-Achse sind die Probennummern mit den farblich gekennzeichneten Stimuli aufgetragen.

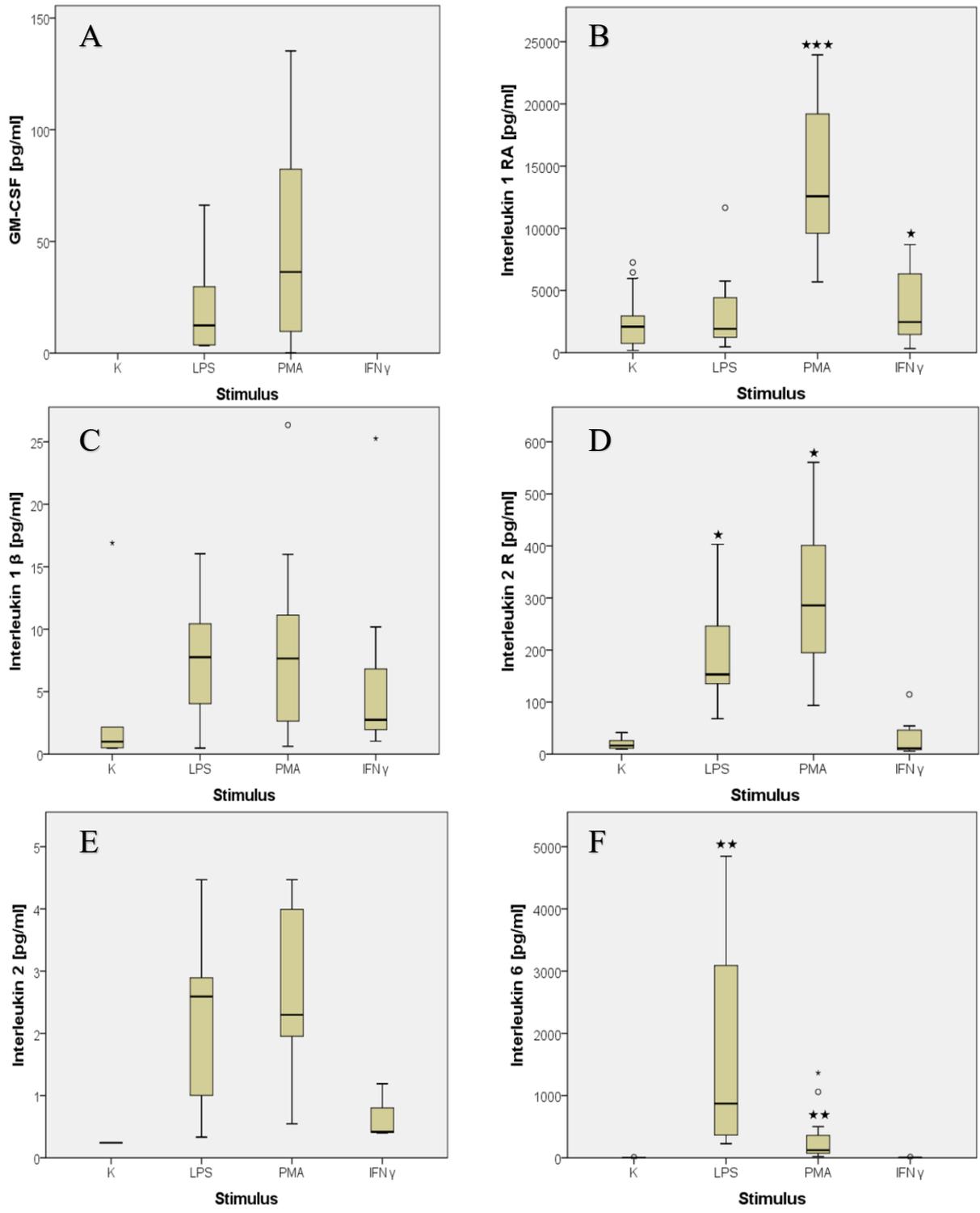
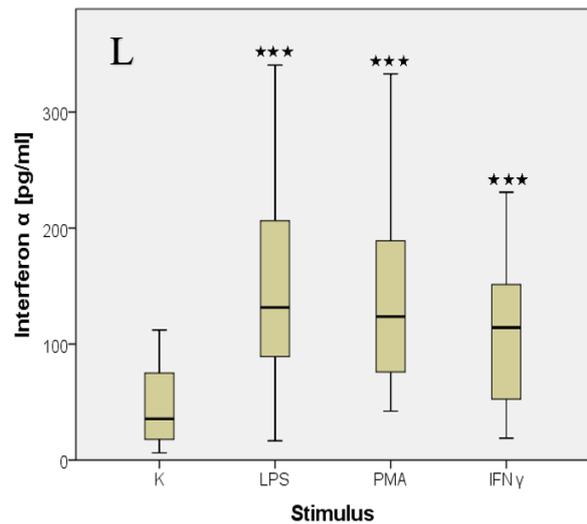
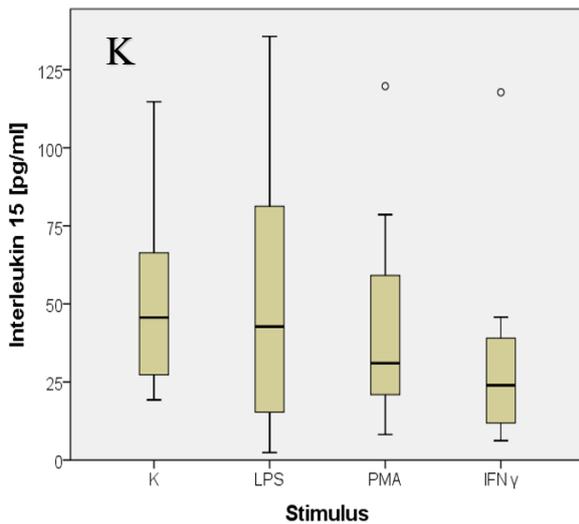
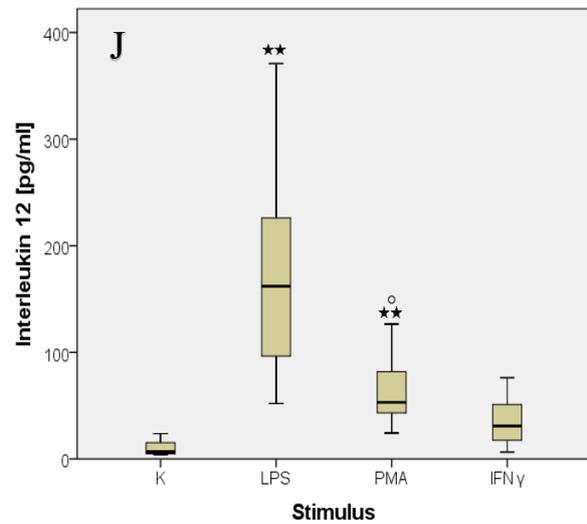
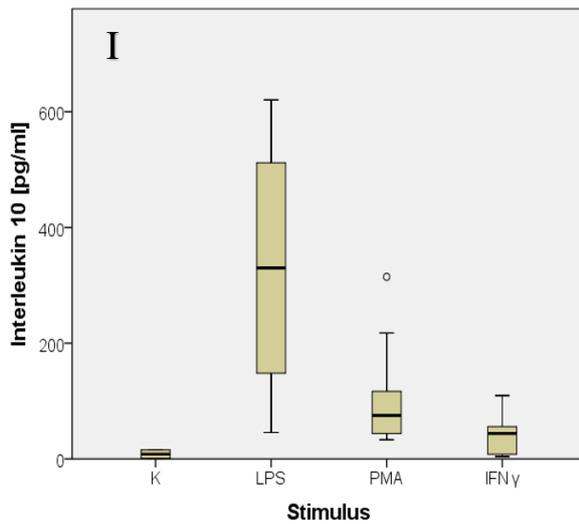
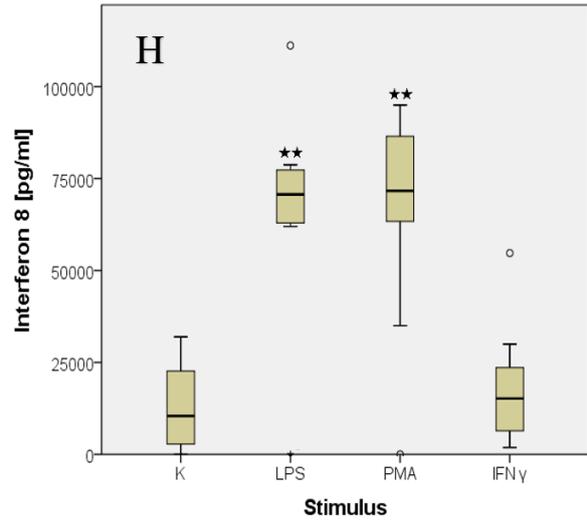
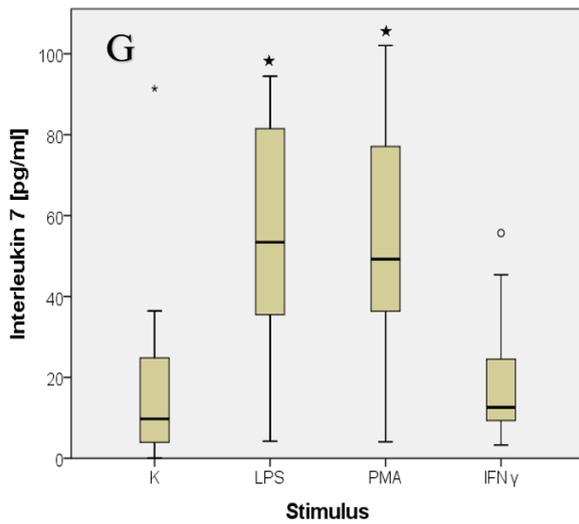
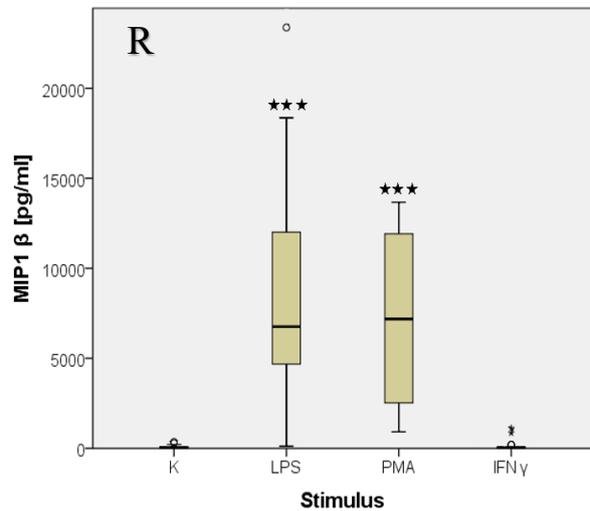
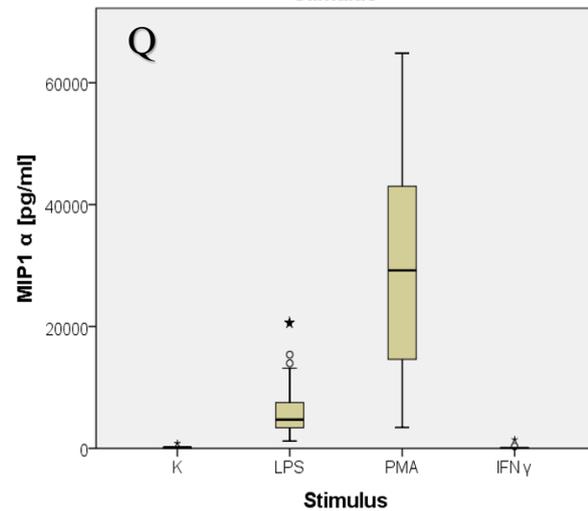
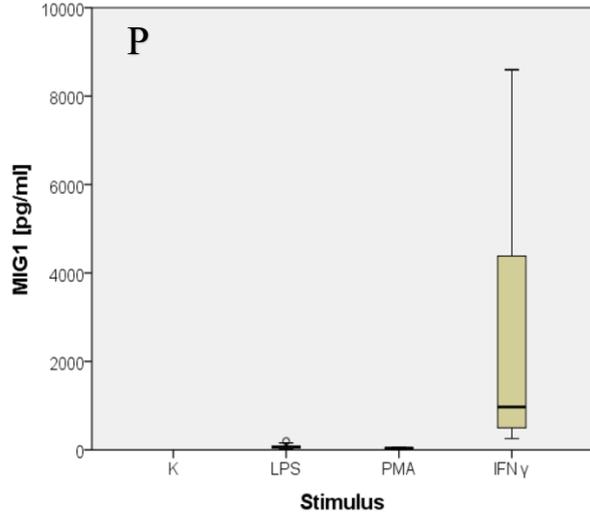
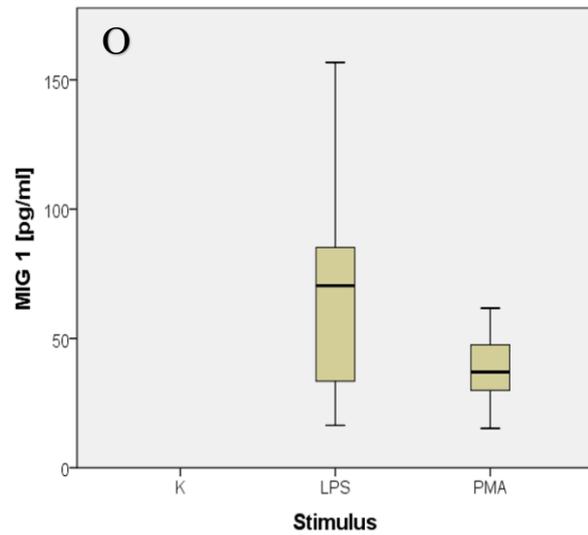
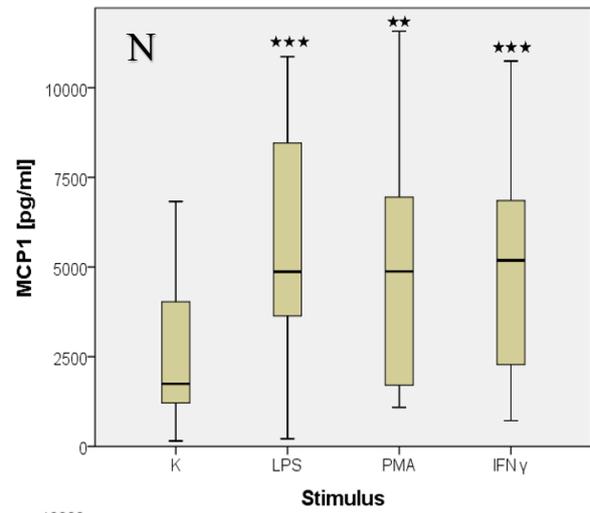
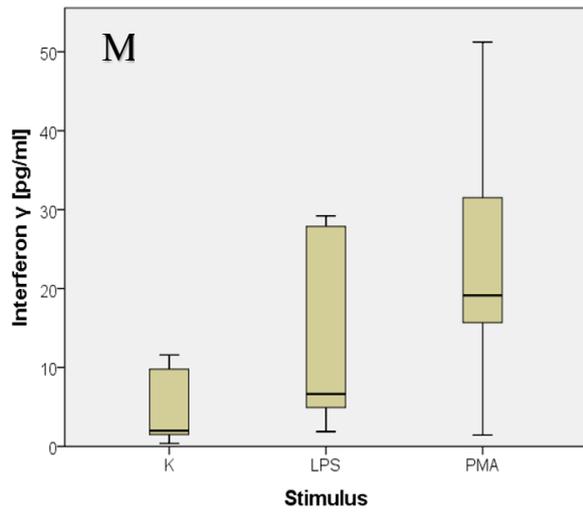


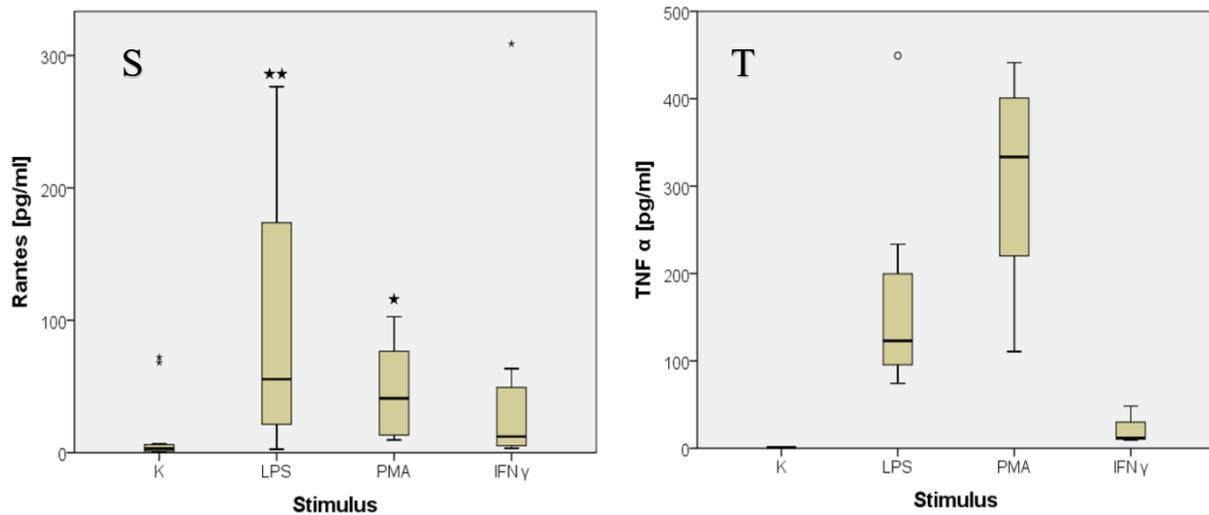
Abbildung II: Aufgetragen sind die Zytokinfreisetzung gegen die verschiedenen Stimuli in Boxplots. Dabei sind auf der x-Achse die drei verwendeten Stimuli (LPS, PMA, Interferon γ) notiert und die Kontrolle (K). Die Signifikanzen sind auf einen Unterschied des jeweiligen Stimulus im Vergleich zur Kontrolle bezogen. Bei einigen Zytokinen lagen die Kontrollmessungen unterhalb des Messniveaus, sodass kein signifikanter Unterschied angegeben werden kann. Ein Stern gibt ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ an, zwei Sterne bedeuten $p < 0,01$ und drei Sterne $p < 0,001$.



Fortsetzung Abbildung II: Aufgetragen sind die Zytokinfreisetzung gegen die verschiedenen Stimuli in Boxplots. Dabei sind auf der x-Achse die drei verwendeten Stimuli (LPS, PMA, Interferon γ) notiert und die Kontrolle (K). Die Signifikanzen sind auf einen Unterschied des jeweiligen Stimulus im Vergleich zur Kontrolle bezogen. Bei einigen Zytokinen lagen die Kontrollmessungen unterhalb des Messniveaus, sodass kein signifikanter Unterschied angegeben werden kann. Ein Stern gibt ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ an, zwei Sterne bedeuten $p < 0,01$ und drei Sterne $p < 0,001$. Aus Übersichtsgründen sind folgende Ausreißer nicht graphisch dargestellt: IL 10 (durch eine LPS Stimulation erreichte Werte von 1187 pg/ml und 1242 pg/ml); IL 12 (durch eine LPS Stimulation erreichter Wert von 446 pg/ml); IL 15 (durch eine PMA Stimulation erreichter Wert von 174 pg/ml); Interferon α (durch eine LPS Stimulation erreichter Wert von 440 pg/ml).



Fortsetzung Abbildung II: Aufgetragen sind die Zytokinfreisetzung gegen die verschiedenen Stimuli in Boxplots. Dabei sind auf der x-Achse die drei verwendeten Stimuli (LPS, PMA, Interferon γ) notiert und die Kontrolle (K). Die Signifikanzen sind auf einen Unterschied des jeweiligen Stimulus im Vergleich zur Kontrolle bezogen. Bei einigen Zytokinen lagen die Kontrollmessungen unterhalb des Messniveaus, sodass kein signifikanter Unterschied angegeben werden kann. Ein Stern gibt ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ an, zwei Sterne bedeuten $p < 0,01$ und drei Sterne $p < 0,001$. Aus Übersichtsgründen sind folgende Ausreißer nicht graphisch dargestellt: IL 10 (durch eine LPS Stimulation erreichte Werte von 1187 pg/ml und 1242 pg/ml); IL 12 (durch eine LPS Stimulation erreichter Wert von 446 pg/ml); IL 15 (durch eine PMA Stimulation erreichter Wert von 174 pg/ml); Interferon α (durch eine LPS Stimulation erreichter Wert von 440 pg/ml).



Fortsetzung Abbildung II: Aufgetragen sind die Zytokinfreisetzung gegen die verschiedenen Stimuli in Boxplots. Dabei sind auf der x-Achse die drei verwendeten Stimuli (LPS, PMA, Interferon γ) notiert und die Kontrolle (K). Die Signifikanzen sind auf einen Unterschied des jeweiligen Stimulus im Vergleich zur Kontrolle bezogen. Bei einigen Zytokinen lagen die Kontrollmessungen unterhalb des Messniveaus, sodass kein signifikanter Unterschied angegeben werden kann. Ein Stern gibt ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ an, zwei Sterne bedeuten $p < 0,01$ und drei Sterne $p < 0,001$. Aus Übersichtsgründen sind folgende Ausreißer nicht graphisch dargestellt: Rantes (durch eine PMA Stimulation erreichter Wert von 521 pg/ml; des Weiteren durch eine LPS Stimulation hervorgerufene Werte von 447 pg/ml und 521 pg/ml); TNF α (durch eine LPS Stimulation erreichter Wert von 541 pg/ml; des Weiteren durch eine PMA Stimulation hervorgerufener Wert von 737 pg/ml).

12. Appendix II



UKS
Universitätsklinikum
des Saarlandes

**Klinik für Innere Medizin II -
Gastroenterologie, Hepatologie,
Endokrinologie, Diabetologie
und Ernährungsmedizin**

Patienteninformation für die Studie

**Die Rolle von Integrin beta 3 (ITGB3) bei Diabetes Mellitus und
diabetischen Folgeerkrankungen**

Durchführende Zentren:

- Klinik für Innere Medizin II, Universitätsklinikums des Saarlandes
- Fliedner Krankenhaus, Neunkirchen
- Niedergelassene diabetisch tätige Praxen im Saarland

Verantwortliche:

- Prof. Dr. Frank Lammert
- Prof. Dr. med. Jochen Schneider
- Dr. rer. nat. Ellen Damm
- Cand. Med. Philipp Helmer

Kontakt-Telefonnummer: aus Datenschutzgründen in der Dissertation nicht angegeben

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

wir möchten Sie zur Teilnahme an einer Forschungsstudie einladen. Bevor Sie teilnehmen, sollten Sie verstehen, warum diese Forschung durchgeführt wird und was dies für Sie bedeuten würde. Bitte nehmen Sie sich die Zeit, um die folgenden Informationen sorgfältig zu lesen und diskutieren Sie die Informationen mit anderen, wenn Sie es möchten. Bitte fragen Sie uns, wenn etwas nicht klar ist, oder wenn Sie weitere Informationen wünschen.

Was ist der genaue Zweck dieser Studie?

Arteriosklerose (Schlagaderverhärtung) kann sämtliche Schlagadern des Körpers befallen. Der Befall der Herzkranzgefäße (KHK: Koronare Herzkrankheit) führt zur Verdickung der Gefäßwand. In der Folge kann es zu zunehmender Verengung des Gefäßes (Angina Pectoris) bis zum völligen Verschluss (Herzinfarkt) kommen. Begünstigende Faktoren für die Entstehung solcher Veränderung sind vornehmlich Bluthochdruck, erhöhte Fett- und Zuckerwerte im Blut sowie Rauchen, Stress und Übergewicht. Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass neben den o. g. Risikofaktoren auch besonders genetische Faktoren ursächlich sind. Genetische Faktoren können einen Einfluss auf Eigenschaften von bestimmten Zellen des Immunsystems, sogenannten Monozyten haben. Es wird vermutet, dass eine Veränderung der Oberflächenbeschaffenheit der Monozyten Auswirkungen auf das Schlaganfallrisiko von Patienten mit Diabetes Mellitus haben kann. Das Ziel der Studie ist es, die Rolle von Monozyten und Integrin beta 3 (ITGB3) und anderen genetischen Faktoren bei der Entstehung der Folgeerkrankungen eines Diabetes Mellitus zu untersuchen. ITGB3 ist in die Oberfläche der Zellen integriert und spielt bei verschiedenen Funktionen der Zelle eine Rolle. Durch die Erkenntnisse dieser Studie sollen in Zukunft neue Behandlungsstrategien für Patienten mit Diabetes Mellitus und deren Folgeerkrankungen gefunden werden.

Wer kann teilnehmen?

Wir suchen Patienten mit einem Diabetes Mellitus.

Ablauf der Studie:

Besuch 1: Sie bekommen Blut aus einer Vene abgenommen, das für genetische Untersuchungen verwendet wird. Dabei suchen wir nach bestimmten genetischen Variationen, die in der Diskussion steht, mitverantwortlich für verschiedene diabetische Folgeerkrankungen zu sein.

Besuch 2: Falls die genetische Variation bei Ihnen nachgewiesen werden kann, wird noch einmal Blut abgenommen um Immunzellen (Monozyten) zu untersuchen. Dabei werden die Immunzellen auf ihr Verhalten bei einer Aktivierung untersucht. Ebenfalls benötigen wir eine kleine Kontrollgruppe, die die Varianten nicht tragen.

Wie werden die Proben gewonnen und verwendet?

Die entnommene Blutprobe wird sofort mit einer Identifizierungsnummer versehen (verschlüsselt / kodiert), sodass Ihr Name und weitere personenbezogene Daten nicht mehr erkennbar sind. Die Zuordnung Ihrer Probe zu Ihrer Person ist ausschließlich dem Studienarzt möglich. Das Erbmateriale, die sog. DNA, wird aus der bereits kodierten Probe isoliert und nochmals mit einer neuen Nummer versehen. Somit ist Ihr Erbmateriale doppelt verschlüsselt. Die Ergebnisse der genetischen Analysen werden getrennt von Ihren personenbezogenen Daten gespeichert und können nicht ohne Mitwirkung des Studienarztes Ihrer Person zugeordnet werden.

In Zukunft gibt es jedoch möglicherweise neue wissenschaftliche Fragestellungen im Rahmen der unter 1. genannten Zielsetzungen, die mithilfe Ihrer Probe beantwortet werden können. Deshalb kann heute noch nicht festgelegt werden, wie lange Ihre Probe aufbewahrt wird. Die Probe wird Eigentum von der Universität des Saarlandes. Sie wird dort aufbewahrt, aber unter Umständen auch an andere Stellen (z. B. Labore), gegebenenfalls auch ins Ausland, verschickt. Gleichwohl haben Sie jederzeit das Recht, die Vernichtung Ihrer Probe zu verlangen.

Kosten

Die Blutabnahme ist kostenfrei.

Wird meine Teilnahme vertraulich behandelt?

Wie bereits beschrieben, werden Ihre Blutprobe und die benötigten Daten jeweils separat mit einer unterschiedlichen Code-Nummer gekennzeichnet. Namentlich werden Sie nicht genannt. Die im Rahmen dieses Projekts aufgezeichneten Daten und Analyseergebnisse werden ohne Ihren Namen ermittelt, wissenschaftlich ausgewertet und den gesetzlichen Bestimmungen entsprechend archiviert.

Einzelheiten zur Einwilligung in die Datenerhebung und –verwendung, auch zur Möglichkeit eines Widerrufs, entnehmen Sie bitte der Einwilligungserklärung, die im Anschluss an diese Information abgedruckt ist.

Nutzen und Risiken

Sie werden während dieser Studie gebeten, Blutproben abzugeben. Es bestehen nur die Risiken, die mit einer normalen Blutentnahme verbunden sind. Die Entnahme einer Blutprobe ist in der Regel nur mit einem sehr geringen Risiko verbunden. An der Einstichstelle kann es zu leichten Schmerzen kommen oder es kann ein Bluterguss (blauer Fleck) entstehen, der evtl. einige Tage sichtbar ist. In äußerst seltenen Fällen kann auch die Bildung eines Blutgerinnsels (Thrombose), eine örtlich begrenzte Entzündung oder eine Infektion an der Einstichstelle auftreten oder es kann zu dauerhaften Schädigungen von Blutgefäßen oder Nerven kommen. Durch die standardisierte Blutentnahme können Schwindel und Unwohlsein vorübergehend auftreten.

Was passiert mit den Ergebnissen dieser Studie?

Alle Daten werden pseudonymisiert erfasst. Da Sie auch nach der Einwilligung jederzeit von Ihrer Teilnahme an der Studie zurücktreten können, wird eine Quelldatei angelegt, mit deren Hilfe die Proben wieder zugeordnet und vernichtet werden können. Der Zugang ist durch ein Passwort geschützt, welches nur den teilnehmenden Ärzten und dem Doktoranden bekannt ist. Die Ergebnisse dieser Studie werden in einer wissenschaftlichen Zeitschrift veröffentlicht. Ihre persönlichen Daten werden in diesem Dokument nicht erkennbar sein und Sie werden in keinerlei Weise identifizierbar sein. Die Ergebnisse werden uns helfen den potenziellen Nutzen von Medikamenten, wie z. B. nicht-selektiven ITGB3-Antagonisten im Bereich diabetischer Folgeerkrankungen zu verifizieren und die Rolle von Monozyten in der Entstehung von arteriosklerotischen Gefäßerkrankungen besser zu verstehen. Diese Studie erfolgt in einer Kooperation mit der Universität Luxembourg.

Kann ich meine Teilnahme an dem Forschungsprojekt vorzeitig beenden?

Sie können jederzeit, auch ohne Angabe von Gründen, Ihre Teilnahme beenden, ohne dass Ihnen dadurch irgendwelche Nachteile entstehen. Im Falle des Widerrufs können Sie entscheiden, ob Ihre Blutproben vernichtet werden sollen oder in anonymisierter Form (also ohne die Möglichkeit für den Studienarzt, weiterhin einen Bezug zwischen der Probe und Ihrer Person herzustellen) für weitere wissenschaftliche Zwecke verwendet werden dürfen. Die Bedeutung eines Widerrufs für die Verwendung der Daten ist in der Einwilligungserklärung erläutert, die im Anschluss an diese Information abgedruckt ist.

Kann ich bestimmte Verwendungszwecke ausschließen?

Sie haben das Recht, bestimmte Verwendungen Ihrer Blutprobe auszuschließen.

Weitere Informationen

Sollten Sie noch weitere Fragen haben, wenden Sie sich bitte an Ihren Studienarzt. Stellen Sie alle Fragen, die Ihnen wichtig erscheinen und lassen Sie sich ausreichend Zeit für Ihre Entscheidung zur Teilnahme an dieser zusätzlichen wissenschaftlichen Untersuchung.

WICHTIG

Die Teilnahme an dieser Studie ist absolut freiwillig. Sie können jederzeit die Teilnahme an der Studie durch den Widerruf der Einverständniserklärung beenden. Sollten Sie sich gegen eine Teilnahme entschließen oder Ihr Einverständnis nachträglich zurückziehen, so entstehen Ihnen hierdurch keine Nachteile! Wenn Sie einer ersten Blutentnahme zugestimmt haben und Ihr Blut genetisch untersucht wurde, können Sie trotzdem jederzeit einer zweiten Blutentnahme zur Untersuchung der Immunzellen widersprechen, ohne Angabe von Gründen.

Für Ihre Mitarbeit an dieser wichtigen Untersuchung möchten wir uns herzlich bedanken!



UKS
Universitätsklinikum
des Saarlandes

**Klinik für Innere Medizin II -
Gastroenterologie, Hepatologie,
Endokrinologie, Diabetologie
und Ernährungsmedizin**

Einwilligungserklärung

Name: _____

Geburtsdatum: _____

Das Original dieser Einwilligungserklärung verbleibt bei den Unterlagen. Eine Kopie der Einwilligungserklärung wird dem Patienten ausgehändigt.

Ich _____

(Vorname, Name)

erkläre, dass ich die Probanden-/Patienteninformation zur wissenschaftlichen Untersuchung:

Die Rolle von Integrin beta 3 (ITGB3) bei Diabetes Mellitus und diabetischen Folgeerkrankungen

und diese Einwilligungserklärung erhalten habe.

- Ich wurde für mich ausreichend mündlich und schriftlich über die wissenschaftliche Untersuchung informiert.
- Ich erkläre, dass ich damit einverstanden bin, dass Blut, welches entnommen wird für die o. g. wissenschaftliche Untersuchung genutzt werden kann.
- Ich weiß, dass ich jederzeit meine Einwilligung, ohne Angaben von Gründen widerrufen kann, ohne dass dies für mich nachteilige Folgen hat.

Einwilligung über genetische Untersuchung des zur Forschung entnommenen Materials (peripheres Blut):

Bitte entscheiden Sie sich, wie Ihre Proben genutzt werden dürfen. Nachdem die nachfolgenden Fragen ausführlich mit Ihnen erörtert wurden, beantworten Sie bitte diese mit durch Einkreisen von **Ja** oder **Nein**.

Ich bin damit einverstanden, dass meine Proben für die genetischen Untersuchungen verwendet werden können.	Ja	Nein
--	----	------

Ich bin damit einverstanden, dass meine Monozyten gesondert untersucht werden können.	Ja	Nein
---	----	------

Ich wurde darüber aufgeklärt, dass ich jederzeit einer zweiten Blutentnahme widersprechen kann, auch wenn ich an dem genetischen Screening teilgenommen habe.	Ja	Nein
---	----	------

Ich möchte, dass meine Proben nach der genetischen Untersuchung vernichtet werden.	Ja	Nein
--	----	------

Falls ich nicht mehr an der Untersuchung teilnehmen möchte, sollen meine Proben vernichtet werden.	Ja	Nein
--	----	------

Ich bin damit einverstanden, dass meine Proben für zukünftige genetische Forschung zum Thema arteriosklerotische Gefäßerkrankungen aufbewahrt werden können.	Ja	Nein
--	----	------

Ich bin damit einverstanden, dass meine Proben auch für andere genetische Forschungsprojekte genutzt werden können.	Ja	Nein
---	----	------

Ich bin damit einverstanden, dass meine Proben anonym auch an andere Forscher für genetische Forschung, die mit meiner Erkrankung zu tun haben, versendet werden können.	Ja	Nein
--	----	------

Ich bin damit einverstanden, dass einer der Forscher (oder jemand der von ihm bestimmt wird) mit mir in Zukunft Kontakt aufnimmt.	Ja	Nein
---	----	------

_____ den, _____
 (Ort) (Datum) (Patient)

_____ den, _____
 (Ort) (Datum) (aufklärender Arzt)