Universitätsklinikum Ulm
Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin II – Kardiologie
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Vinzenz Hombach

Telmisartan inhibiert die Chemokin-induzierte Migration CD4-positiver Lymphozyten

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Katrin Verena Raps
aus Oberstdorf
2007

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Nikolaus Marx

2. Berichterstatter: PD Dr. Georg von Boyen

Tag der Promotion:18. Dezember 2008

Abkürzungsverzeichnis 4

1. EINLEITUNG 6

1.1. Arteriosklerose 6

1.2. T-Zellmigration 8

1.3. Telmisartan 10

1.4. Peroxisome proliferator-activated-Receptors [PPARs] 13

1.5. Fragestellung 15

2. MATERIAL UND METHODIK 16

2.1. Material 16

2.2. Methodik 18

3. ERGEBNISSE 27

3.1. Effekt von Telmisartan 27

3.2. Effekt von Eprosartan auf die chemokininduzierte Migration 29

3.3. Effekt von Telmisartan bei Vorbehandlung mit Eprosartan 30

3.4. Vitalität 31

3.5. ICAM-3-Färbung 32

4. DISKUSSION 34

4.1. Telmisartan als PPAR-γ-Aktivator 34

4.2. ATII-rezeptorunabhängige Effekte von Telmisartan 36

4.3. Effekt auf Arteriosklerose 37

4.4. Klinische Ausblicke 37

5. ZUSAMMENFASSUNG 40

6. LITERATURVERZEICHNIS 42

Abkürzungsverzeichnis

ACE-Hemmer	Angiotensin-Converting-Enzyme-Hemmer
AT-II-Rezeptorblocker	Angiotensin-II-Rezeptorblocker
C	Cysteinmolekül
CD	Cluster of Differentiation
CRP	C-reaktives Protein
DAPI-Färbung	4`,6-Diamidino-2-phenylolole-Färbung
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Hb	Hämoglobin
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IL	Interleukin
LDL	Low density Lipoprotein
M	molar
MACS	Magnetic cell sorting
MAP-Kinase	mitogenaktivierende Proteinkinase
MHC	major histocompatibility complex
Min	Minute
Mio	Millionen
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
PBS	Phosphate buffered saline
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
R	Rezeptor

RAAS	Renin Angiotensin Aldosteron System
RANTES	Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
RPM	Rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute, Zellkulturmedium
RT	Raumtemperatur
SDF-1α	Stromal cell-Derived Factor-1Alpha
T_H	T-Helferzelle
T-Lymphozyt	CD4-postiver Lymphozyt
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor-α
TZD	Thiazolidinedione
VSMCs	Vascular smooth muscle cells
WHO	World Health Organisation
X	Aminosäure

1. Einleitung

1.1. Arteriosklerose

Arteriosklerose und ihre Komplikationen verursachen in der westlichen Welt und Japan die meisten Todesfälle.
Obwohl schon zahlreiche Theorien über die Entstehung der Arteriosklerose aufgestellt wurden, ist es immer noch nicht gelungen, den ganzen komplexen Prozess der Atherogenese aufzudecken. [14]
Laut World Health Organisation [WHO] handelt es sich um eine variable Kombination von Veränderungen der Intima, bestehend aus einer herdförmigen Ansammlung von Fettsubstanzen, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterien-media. [42]

Für das Auftreten und den Verlauf der Atherogenese sind zahlreiche Risikofaktoren bekannt, die zu einer endothelialen Dysfunktion und dadurch zur Arteriosklerose führen: das Rauchen, Lipidstoffwechsel-störungen, Diabetes mellitus, genetische Faktoren und Bluthochdruck sind von größter Bedeutung. Außerdem spielen Bewegungsmangel, Fehlernährung, Übergewicht und ein erhöhter Wert des Homocysteins im Plasma, sowie entzündliche Mikroorganismen eine Rolle. [21,43]

Entzündungsprozesse sind eine Ursache für die Entstehung der Arteriosklerose. Sie kommt vor allem in großen und mittleren Arterien vor und kann zu ischämischen Geschehen in Herz, Gehirn und den Extremitäten führen. [43]
Relativ wahrscheinlich ist die Hypothese der chronischen Entzündungsreaktion, bei der Lipoproteine, Monozyten, T-Lymphozyten, Endothel- und glatte Muskelzellen, sowie die extrazelluläre Matrix der Arterienwand involviert sind. [14]

Als Folge der chronischen Entzündung sind zahlreiche Faktoren, wie zum Beispiel C-reaktives Protein [CRP], Zytokine, Adhäsionsmoleküle und E-Selektin im Plasma erhöht und können zur Abschätzung weiterer kardiovaskulärer Ereignisse herangezogen werden. [1]

Die Frühphase vor der Entstehung der arteriosklerotischen Läsion ist durch die endotheliale Dysfunktion gekennzeichnet. [30] Chemokine aus dem Endothel führen zur Anlockung von Monozyten und T-Lymphozyten. [1]
Die in die Intima gewanderten Monozyten differenzieren zu Makrophagen aus, die die modifizierten Lipoproteinpartikel phagozytieren und so zu Schaumzellen werden. Dieses Anfangs-stadium der Atherogenese wird auch als „fatty streak"- Bildung bezeichnet. Glatte Muskelzellen der Media wandern an die Arterienwand, wo sie eine faserreiche Schicht, die fibröse Kappe, bilden. [37] Der Lipidkern besteht aus apoptotischen Schaumzellen, Lipiden und nekrotischen Zellen. [24,43]
Die Schaumzellen verstärken die Entzündungsreaktion durch erneute Bildung von Botenstoffen. [37] Ferner werden matrixdegradierende Enzyme gebildet, welche zur Ausdünnung der fibrösen Kappe beitragen, wodurch die Plaque instabil wird. [22]
Bei einer Plaqueruptur entsteht ein Gerinnsel, das den Blutstrom im betreffenden Gefäß blockiert. [23]

1.2. T-Zellmigration

1.2.1. T-Lymphozyten

T-Lymphozyten vermitteln die zelluläre Immunität. Sie entstammen aus den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks, wandern aber schon früh zur Reifung in den Thymus. Diese Zellart ist in allen sekundär lymphatischen Organen zu finden und differenzieren sich weiter zu Cluster of Differentiation 4- [CD4-] oder CD8-positiven Lymphozyten aus. CD4-positive Zellen werden auch als T-Helfer-Zellen bezeichnet und können in zwei weitere Gruppen unterteilt werden: T_H1-Zellen, die bei Entzündungs-reaktionen Interleukin-2 und Tumornekrosefaktor-α bilden und dadurch makrophagenaktivierend wirken, und T_H2-Zellen, die durch Bildung von Interleukin-3,-4,-5,-6,-10 und –13 die humorale Immunität regulieren und die B-Lymphozyten aktivieren.
Die CD8-positiven Lymphozyten erkennen an major histocompatibility complex [MHC] Klasse I gebundene Antigene und sind zytotoxisch. [53]

1.2.2. Migration

In der Frühphase der Atherogenese spielt die Adhäsion der Monozyten und Lymphozyten an die Endothelzellen der Arterienwand, gefolgt von der Migration dieser Zellen in die Intima, eine wichtige Rolle. Diese Schritte werden von hohen Lipoproteinkonzentrationen im Plasma und Entzündungsfaktoren, sowie Adhäsionsmolekülen und Zytokinen der Arterienwand beeinflusst. [14]

Durch Einwirkung von Entzündungsmediatoren, wie z.B. IL-1, TNF-α, Thrombin, Histamin und Chemokine, exprimieren die Endothelzellen verstärkt E-Selektin, Integrin und andere Adhäsionsfaktoren. Die Leukozyten können in langsam fließenden Gefäßen, wie Venulen, durch eine rasche Bindung mit geringer Affinität, mit diesen

Selektinmolekülen interagieren. Dadurch abgebremst rollen die Zellen über das Endothel und können durch einen weiteren Rezeptor – das Integrin - haften. Die haftenden Zellen migrieren nun über Diapedese in das Gewebe. [37,40]

Die CD4-positiven Zellen ändern ihre kugelige Form während der Aktivierung durch Chemokine in eine polarisierte Struktur. Der führende Pol beinhaltet die Chemokinrezeptoren, gefolgt vom Zellkörper. Bis zum Antigenkontakt, der eine Umverteilung des Zytoskeletts hervorruft, befinden sich die Adhäsionmoleküle im Endteil. [46,47]

Integrine, die das Anhaften der Lymphozyten vermitteln, müssen - im Gegensatz zu den Selektinen - durch Chemokine aktiviert werden, die an spezifische G-Protein-gekoppelte Oberflächenrezeptoren auf Leukozyten binden. [2]
Chemokine sind eine Untergruppe von proinflammatorisch wirkenden Zytokinen. [40] Sie werden strukturell nach der Position ihrer Cysteingruppe in vier Familien unterteilt:
Bei der CXC- (α-Chemokin-) Gruppe sind die beiden Cysteinmoleküle (C) durch eine andere Aminosäure (X) getrennt, die Rezeptoren heißen CXCRs. Die zweite Chemokinfamilie CC besteht aus zwei Cysteinsäuren und die Rezeptoren werden CCRs genannt. Die beiden weiteren Gruppen werden CX3C und XC genannt und haben jeweils nur einen Rezeptor. [2]

Bisher wurden zahlreiche Moleküle identifiziert, die chemotaktisch auf die Migration der CD4-postiven Lymphozyten wirken. In der vorliegenden Arbeit wurden die Chemokine Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted [RANTES] und Stromal cell-Derived Factor-1Alpha [SDF-1α] verwendet.

RANTES ist ein Chemokin, das die T-Zelle auf zweierlei Wegen aktiviert: über G-Protein und Tyrosinkinase. Es wird unter anderem von den Endothelzellen produziert und bindet an den CCR5-Rezeptor der T-Zellen. RANTES scheint die Diapedese der bereits haftenden Zellen zu beeinflussen. [18]

SDF-1α bindet an Fibronektin und nimmt auf diese Weise konzentrationsabhängig Einfluss auf die Migration. Auch die Wirkung von SDF-1α erfolgt nicht über die Adhäsion der T-Zellen, sondern über vermehrte Polarisation und Umverteilung der SDF-1α-Rezeptoren auf der Zelloberfläche. [38]

1.3. Telmisartan

Telmisartan ist ein Angiotensin-II-Rezeptorblocker [AT-II-Rezeptorblocker], wie Losartan, Valsartan, Irbesartan, Candesartan und Eprosartan, der zur Behandlung von arterieller Hypertonie eingesetzt wird. AT-II-Rezeptorblocker sind gleich effektive Antihypertonika wie Calciumkanalblocker, Betablocker, und Angiotensin-Converting-Enzyme-Hemmer [ACE-Hemmer] und verursachen weniger unerwünschte Nebenwirkungen. [41]

Im Gegensatz zu den ACE-Hemmern, die die Umwandlung von Angiotensin I in Angiotensin II hemmen, kann das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System [RAAS] durch Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten wirksam blockiert werden. [35]

Eine erhöhte RAAS-Aktivität führt zur Entwicklung von Arteriosklerose, Hypertonie, Linksherzhypertrophie und zum vermehrten Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen, wie Myokardinfarkt, Apoplex und Nierensklerose. [15]

Patienten mit arterieller Hypertonie haben häufig erhöhte Angiotensin-II-Spiegel im Blut. Angiotensin-II, ein Hauptbestandteil des Renin-Angiotensin-Systems, ist ein starker Vasokonstriktor. Außer dass es zu

erhöhtem Blutdruck führt, kann es zur Hypertrophie glatter Muskelzellen und dadurch zu vermehrter Atherogenese beitragen. Hypertonie hat durch eine Erhöhung der freien Radikale und Angiotensin-II als Regulator der NF-κB-Familie, die zur Zytokinfreisetzung beiträgt, auch proinflammatorische Eigenschaften. [1,43]
Aber auch die hämodynamische Auswirkung des Bluthochdrucks verursacht Endothelschäden, die die Entwicklung der Arteriosklerose fördern. [42]

Angiotensin II spielt durch die Aktivierung der Entzündungszellen und Expression von Adhäsionsmolekülen und Zytokinen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Entzündungsprozessen. Daher kann durch dessen Blockade die Arteriosklerosebildung vermindert werden. [9,15]
Das Peptidhormon Angiotensin II entsteht unter dem Einfluss des Angiotensin-Converting-Enzymes aus Angiotensin I und beeinflusst über zwei Rezeptorsubtypen den Blutdruck. [33]
Für die Vasokonstriktion, Aldosteron-, Katecholamin-, und Vasopressinfreisetzung, sowie die Zellproliferation und die renalen Effekte, wie verstärkte Natriumrückresorption, ist der AT_1-Rezptor verantwortlich. [17,33] AT_2-Rezeptorstimulation führt zu einer Proliferationshemmung, Vasodilatation und Dehnung des Herzmuskels. [35,48]

Sartane sind Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten, die selektiv den AT_1-Rezeptoren blockieren. [35]
Der AT_1-Rezeptor-Subtyp gehört zu einem komplexen Signalweg, der den sieben-transmembranären G-Protein-gekoppelten second massenger beinhaltet. Er ist in verschiedenen Phosphorylierungswegen mit Phospholipasen, Adenylatcyclasen und Calciumionenkanälen verknüpft. [48]

Telmisartan ist ein oral wirksamer, nicht-peptidischer Angiotensin-Rezeptor-Blocker mit einer basischen Imidazol - Grundstruktur. [54]

Angiotensin II-Rezeptorblocker haben bei Patienten mit diabetischer Nephropathie eine Wirkung, die das Fortschreiten der Proteinurie verzögert. In einigen klinischen Studien konnte eine vergleichbare nierenprotektive Wirkung bei Typ-II-Diabetikern zu ACE-Hemmern nachgewiesen werden. [5,6]
Sartane werden sehr gut vertragen und haben ein geringes Nebenwirkungsspektrum, das ähnlich dem der Placebogruppe ist. [11]
Neben der guten Verträglichkeit weisen die Angiotensin-Rezeptor-Blocker auch einen pleiotropen Effekt in den Endorganen auf. [4]

Telmisartan wirkt spezifisch mit hoher Affinität für den AT_1-Rezeptor. Es dissoziiert sehr langsam vom Rezeptor und bindet sogar länger als Angiotensin II selbst. Daher und durch eine lange Halbwertszeit resultiert eine Wirkdauer von über 24 Stunden, [25,36] insbesondere in den letzten 6 Stunden dieser Phase. [7,16]
Im Vergleich zu anderen Sartanen zeigt Telmisartan, eine Reduktion von systolischen als auch diastolischen Blutdruckwerten. [36]
Telmisartan reduziert außerdem den Blutzucker, freies Insulin, die Insulinresistenz und den HbA_{1c}-Wert bei Patienten mit metabolischem Syndrom. [51]

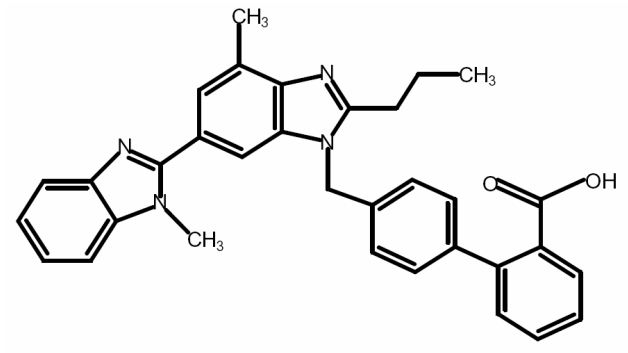

Abb 1: Strukturformel von Telmisartan [35], S. 581

Es besteht eine strukturelle Ähnlichkeit zwischen Telmisartan und Pioglitazon, einem PPARγ-Ligand, der zur Behandlung von Diabetes mellitus Typ eingesetzt wird. [8,20]

Telmisartan, ein Angiotensin-II-Rezeptorblocker, weist auch Eigenschaften eines PPAR-γ-Teilagonisten auf. Dadurch reguliert es die Expression von PPAR-γ-Zielgenen, die den Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel beeinflussen. [8,55] PPAR-γ-Agonisten sind daher Medikamente zur Behandlung der Insulinresistenz und des metabolischen Syndroms. [20]

Im Gegensatz zu Telmisartan weisen andere Angiotensinrezeptorblocker, wie Eprosartan, diese Eigenschaft des PPARγ-Aktivators nicht auf. [44]

1.4. Peroxisome proliferator-activated-Receptors [PPARs]

Peroxisome proliferator-activated-Receptors [PPARs] sind nukleäre Transkriptionsfaktoren, die die Genexpression bestimmter Zielgene regulieren [36] und zu der Gruppe der Steroid- und Schilddrüsenhormonrezeptoren gehören. [31]

Nach der Anlagerung von spezifischen Liganden bilden die PPARs mit dem Retinoid-X-Rezeptor einen heterodimeren Komplex und aktivieren durch die Anlagerung an die PPAR response elements der Promoterregion die Expression von zugehörigen Zielgenen. Es werden drei Rezeptorsubtypen unterschieden: PPAR-α, -δ, und -γ. [27]

PPAR-α kommt in Zellen mit hohem Umsatz von Fettsäuren, wie Leber, Muskel, Herz und Haut, vor. PPAR-δ spielt eine Rolle in der embryonalen Entwicklung und in Adipozyten. PPAR-γ wird hauptsächlich in Fettgewebe, Dickdarm und Gefäßwänden exprimiert. PPAR-α und -γ wurde auch in Immunzellen, wie Monozyten, B- und T-Lymphozyten, nachgewiesen. [3]

In vaskulären Zellen werden die Subtypen PPAR-α und PPAR-γ exprimiert und regulieren dort die Expression von Genen, die für die Arteriosklerose entstehung mitverantwortlich sind.

PPAR-α kann durch lipidsenkende Fibratderivate und PPAR-γ durch antidiabetisch wirkende Thiazolidindione aktiviert werden. [26]

PPAR-γ beeinflusst die Insulinsensitivität, den Glucosestoffwechsel, die Adipogenese und reduziert die Triglyceridspiegel. [8,31]

Dieser Rezeptor hat also auf mehrere Komponenten des metabolischen Syndroms Einfluss. Das metabolische Syndrom besteht aus einer Kombination von Übergewicht, Insulinresistenz, Hyperlipidämie und arterieller Hypertonie. [39]

PPAR-γ ist ein bekanntes Ziel der insulinsensibilitätserhöhenden antidiabetischen Medikamente, wodurch auf molekularer Ebene die metabolischen Funktionen beeinflusst werden.

Genetische Untersuchungen haben gezeigt, dass Mutationen im PPAR-γ-Gen zu Hyperinsulinämie und zum metabolisches Syndrom führen. [44]

1.5. Fragestellung

In der vorliegenden Studie wird der Einfluss von Telmisartan auf das Migrationsverhalten CD4-positiver Lymphozyten untersucht.
Im Einzelnen stellen sich folgende Fragen:

1. Welchen Effekt hat Telmisartan, als partieller PPARγ-Aktivator, auf das Migrationsverhalten CD4-positiver Lymphozyten?

2. Hat Eprosartan, als nicht PPARγ-Aktivator, denselben Effekt auf das Migrationsverhalten CD4-positiver Lymphozyten wie Telmisartan?

3. Hat Telmisartan einen Einfluss auf die Vitalität der CD4-positiven Zellen?

4. Welchen Effekt hat Telmisartan auf die ICAM-3-Translokation?

2. Material und Methodik

2.1. Material

2.1.1.Geräte und Zubehör

Brutschrank „Hera cell“	Heraeus, Germany
Deckplättchen	Marienfeld, Germany
4-chamber-culture-slides	Falcon, Becton Dickinson, USA
Kimwipes Lite	Kimberly-Clark, USA
Laminar Air Flow Bench “Hera safe”	Heraeus, Germany
Leukosep-Isolationsröhrchen aus Polypropylen mit Filter	Greiner bio-one, Germany
MACS Separation Columns, 25LS Columns; Trennsäule	Miltenyi Biotech, USA
MACS Multi Stand	Miltenyi Biotech, USA
Membran	
Migrationskammer „Standard 48 Well Chemotaxis Chamber“	Neuroprobe
Mikroskop „Axioskop 2plus“	Zeiss, Germany
Neubauer-Zählkammer	Brand, Germany
Objektträger	Glasbläserei Ulm, Germany
Petrischalen 100 mm	Falcon, Becton Dickinson, USA
Pipetten	Gilson, France
Pre-Separations Filters	Miltenyi Biotech, USA
Reagenzgläser	Greiner, Germany
Reaktionsgefäße „Epi“ 1,5 ml	Safe Lock, Eppendorf, Germany
Reaktionsgefäße „Falcon“ 15 ml/50 ml	Becton Dickinson, USA
Zentrifuge	Varifuge 3.0, Heraeus, Germany

2.1.2.Reagenzien und Lösungen

Aqua bidest	Delta-Pharma, Germany
Buffy coats	Blutspendezentrale Ulm, Germany
Collagen I (in 0,5 M Essig-säure)	0,03 mg/ml Collagen I in PBS Sigma Diagnostics, USA
Collagenlösung	100 µl Collagen I + 50 µl NaOH 1N + 10 ml PBS
Cy3-conjugated Affini Pure Goat Anti-Mouse IgG	Jackson Immuno Research Laboratories, Baltimore, USA
DAPI-Reagenz	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Germany
EDTA	Sigma Diagnostics, USA
Eindeckmittel, Vitro-Clud	Langenbrinck, Emmendingen, Germany
Eosin	Dade Behring, Germany
Ethanol	Riedel-de Haen, Germany
Fluorescent Mounting Medium	Dako Cytomation
Humanes Serum	PAA Laboratories GmbH, Austria
Lymphozyten-Separations-Medium, Dichte 1,077 g/ml	PAA Laboratories GmbH, Austria
MACS CD4+ Cell Isolations Kit II	Miltenyi Biotec, USA
MACS Puffer	PBS mit 2 mM EDTA 10 % humanes Serum, 0,5 % BSA
Medium für Lymphozyten	RPMI mit 0,5 % humanes Serum, 1 % Penicillin/Streptomycin
Methanol	Merck, Germany
PBS	PAA Laboratories GmbH, Austria
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Germany
RANTES	Pepro Tech Inc, USA
RPMI 1640	PAA Laboratories GmbH, Austria

SDF-1α	Upstate, USA
Thiazin	Dade Behring, Germany
Trypanblau Lösung 0,5 %	Serva, Germany
Xylol	Merck, Germany

2.2. Methodik

2.2.1. Isolation CD4-positiver Lymphozyten

2.2.1.1. Herkunft des Blutes

Die CD4-positiven Lymphozyten wurden aus dem Blut isoliert, das von der Blutspendezentrale Ulm zu buffy coats aufbereitet wurde. Die buffy coats bestehen aus Leukozyten und Thrombozyten, die bei Separation von Erythrozyten und Plasma des Spenderbluts zur Gewinnung von Blutkonserven gewonnen werden und selbst nicht zur Transfusion geeignet sind.

2.2.1.2. Isolation von mononucleären Zellen aus Blut

Vor Beginn der Zellisolation wurden die Reagenzien für mindestens 10 Minuten im Wasserbad bei einer Temperatur von 37℃ erwärmt. Für jeden buffy coat wurden 4 Leucosep-Isolationsröhrchen benötigt, die auf Höhe der 15 ml [Milliliter] Grenze einen Trennfilter haben. Die Leukosep-Isolationsröhrchen wurden mit je 15 ml Leukozyten-trennmedium Ficoll-Trennlösung gefüllt und 1 Minute [min] bei 2300 Rounds per minute [RPM] bei Raumtemperatur [RT] zentrifugiert, so dass sich die Trennlösung unter dem Filter befand.

Parallel hierzu wurden die buffy coats mit Phosphate buffered saline [PBS] auf 80 ml aufgefüllt und zur Mischung geschwenkt. Je 20 ml wurden davon auf die Leukosep-Isolationsröhrchen verteilt, so dass sich unterhalb des Filters das Leukozytentrennmedium und oberhalb die mit PBS verdünnten buffy coats befanden. Die gefüllten Isolations-röhrchen wurden bei 2500 RPM, 10 min bei RT zentrifugiert.

Dabei wurden die Zellen infolge des Dichtegradienten in folgende Schichten aufgeteilt: Ganz unten auf dem Boden des Reaktionsgefäßes sammelten sich Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten, gefolgt vom Lymphozytenseperationsmedium und der Filterscheibe. Darüber befand sich das restliche Lymphozytenseperationsmedium, eine Schicht aus mononucleären Zellen und darauf das Serum.

Das Serum wurde vorsichtig abgesaugt und verworfen. Die darunter liegende Schicht aus mononucleären Zellen, die die CD4-positiven Lymphozyten enthielten, wurde von jeweils zwei Leukosep-Isolationsröhrchen in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Die Suspension wurde mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und zentrifugiert (1200 RPM, 10 min, RT). Danach befanden sich die Zellen als Pellet am Boden des Röhrchens und der Überstand mit PBS konnte abgesaugt werden. Das Zellpallet wurde zuerst mit einer kleineren Menge PBS resuspendiert bevor das Röhrchen auf 50 ml mit PBS aufgefüllt wurde. Dieser Schritt, der zur Reinigung der Zellen vom restlichen Serum diente, wurde mit PBS + 2 millimolar [mM] Ethylendiamintetraacetat [EDTA] zweimal wiederholt.

Das Zellpellet wurde nach dem Waschschritt mit 10 ml PBS + 2 mM EDTA resuspendiert und durch einen 30 µm-Nylonfilter filtriert um Zellkoagulationen zu separieren, die im folgenden Schritt die Trennsäule verstopfen könnten.

Zur Ermittlung der Zellzahl wurde das Gesamtvolumen im Röhrchen bestimmt und von 10 µl der gut gemischten Zellsuspension mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer im Mikroskop ausgezählt. Parallel hierzu wurde die restliche Suspension herunterzentrifugiert (1200 RPM, 10 min, RT).

2.2.1.3. Magnetische Zellseparation der CD4-positiven Lymphozyten

Alle folgenden Schritte wurden in einem Eiswasserbad und mit auf 4℃ gekühlten Reagenzien und gekühlter Zentrifuge durchgeführt, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden.

Das durch die Zentrifugation im vorigen Schritt gewonnene Zellpellet wurde in Magnetic cell sorting [MACS] und Biotin Antibody Cocktail suspendiert. Es wurden 40 µl MACS-Puffer pro 10^7 Zellen und 10 µl Biotin Antibody Cocktail pro 10^7 Zellen verwendet. Die gut gemischte Suspension wurde bei etwa 4℃ im Wasserbad für 10 m in inkubiert. In diesem Schritt lagerten sich die biotinkonjugierten Antikörper an CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCRγ/δ und Glycophorin A an und markierten somit nicht CD4-positiven Lymphozyten, z.B. CD8-positive Lymphozyten, B-Lymphozyten, Natürliche Killer Zellen, Granulozyten, Monozyten und Erythrozyten.

Danach folgte eine Zugabe von 30µl MACS-Puffer pro 10^7 Zellen und 20µl Anti-Biotin Micro Beads pro 10^7 Zellen. Die wiederum gut gemischte Suspension wurde im Wasserbad für 15 min inkubiert. Hierbei lagerten sich an die biotinkonjugierten Antikörper Anti-Biotin Micro Beads, wodurch die nicht CD4-positiven Zellen magnetisch markiert wurden, die CD4-positiven Lymphozyten dagegen unmarkiert blieben.

Nach der Inkubation wurde das Reagenzglas mit 10-20-fachem MACS-Puffervolumen aufgefüllt und bei 1000 RPM, 10 min bei 4℃ zentrifugiert.

Währenddessen wurde der MACS Multi Stand mit zwei MACS Separationssäulen ohne Stempel aufgebaut und mit 3 ml Puffer gespült. Diese Spüllösung wurde verworfen und zwei frische Reagenzgläser unter die Säulen gestellt.

Das Pellet wurde bis zu einer Zellzahl von 10^8 mit 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Bei höheren Zellzahlen musste die Puffermenge

angepasst werden. Die Suspension wurde auf die zwei Säulen verteilt und dreimal mit je 3 ml MACS-Puffer nachgespült.

Bei dieser Negativselektion wurden die durch die Antikörper magnetisch markierten nicht-CD4-positiven Zellen in der Säule zurückgehalten, die nicht markierten CD4-positiven Zellen wurden mit dem Puffer ausgewaschen.

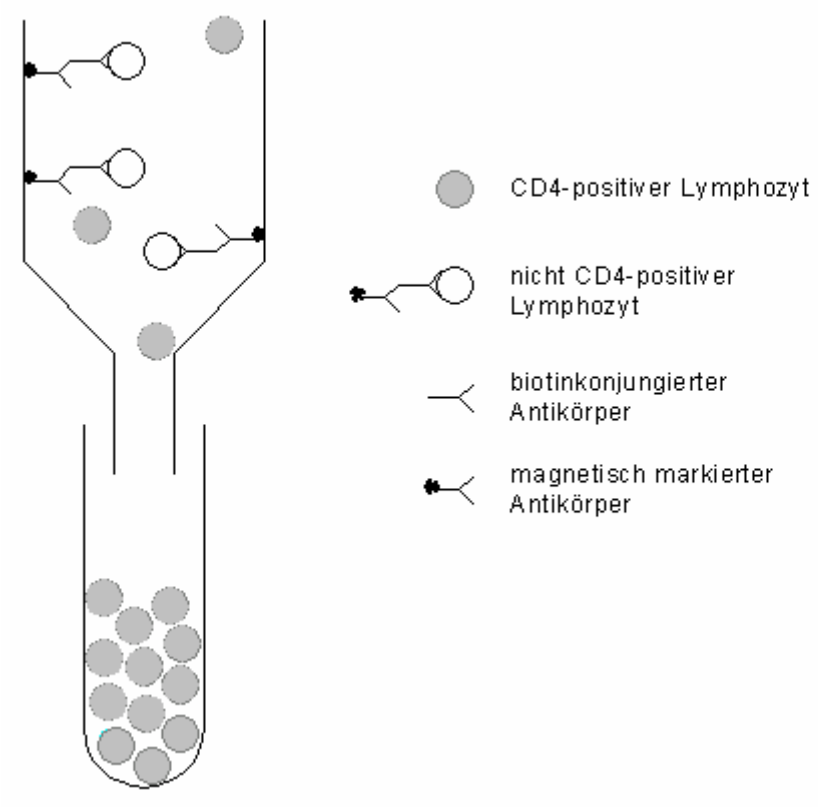

Abb. 2: Schematische Zeichnung der magnetischen Zellseparation

Der so gewonnenen CD4-positiven Zellsuspension wurden 10 µl abgenommen, um die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop zu ermitteln. Die restliche Suspension wurde zentrifugiert (1000 RPM, 10 min, 4℃).

Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet mit auf 37℃ vorgewärmtem Nährmedium (Roswell Park Memorial Institute [RPMI] mit 0,5 % humanem Serum und 1 % Penicillin/Streptomycin) suspendiert und mit 20 ml Nährmedium in eine Zellkulturschale überführt. Die Zellen ruhten über Nacht im Brutschrank bei 37℃.

Die auf diese Weise, im standardisierten Verfahren, gewonnene Zellsuspension erreicht einen Reinheitsanteil an CD4-positiven Zellen der über 95 % liegt.

2.2.2. Migration von CD4-positiven Zellen

Die verwendete Migrationskammer war eine Boyden Chemotaxiskammer mit 48 Vertiefungen, die aus Grund- und Deckplatten, sowie einer Gummidichtung bestand. In allen drei Teilen waren „wells“ in Dreierreihen angeordnet, in die die Proben gegeben wurden. In die Grundplatte wurden die chemotaktischen Substanzen, in die Deckplatte die stimulierte Zellsuspension gegeben. Zwischen die Grundplatte und der Gummidichtung wurde eine polyvinyl-pyrrolidonfreie Polycarbonatmembran mit einer Porengröße von 5 µm eingelegt, durch die die Zellen wanderten. Die Kammer wurde mit 6 Schrauben verschlossen.

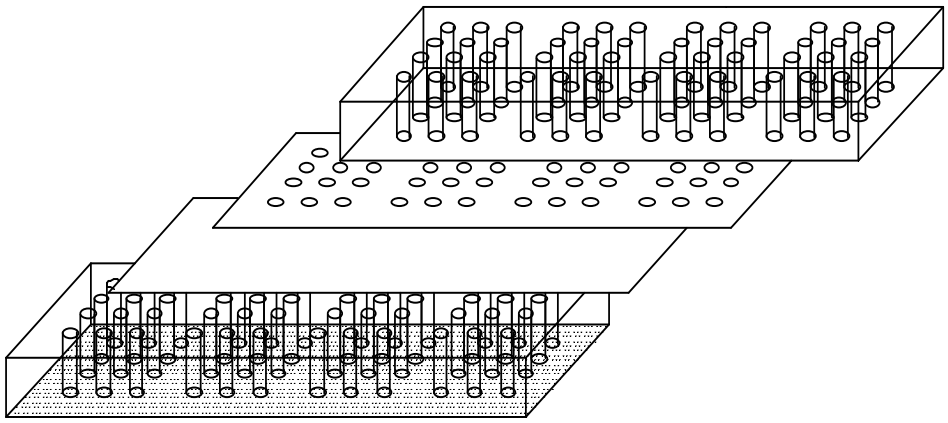

Abb. 3: Skizze einer Boyden Chemotaxiskammer

Der Versuch wurde am Vortag vorbereitet. Hierzu wurde die Kammer im Brutschrank bei 37℃ vorgewärmt und die Membran mit Collagen I über Nacht bei Raumtemperatur beschichtet, indem sie in eine Petrischale mit Collagen I gelegt wurde.

Am nächsten Tag wurden zuerst die Membranen aus dem Collagen I genommen und an der Luft für etwa eine halbe Stunde zum Trocknen aufgehängt. Zur gleichen Zeit wurde das RPMI im Wasserbad auf 37℃ aufgewärmt. Die Zellen, die sich über Nacht im Nährmedium im Brutschrank befanden, wurden bei 1200 RPM, 10 min, RT zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und verworfen.
Die Zellen wurden in 10 ml RPMI gelöst und 10 µl der Suspension zur Zellzahlbestimmung in einer Neubauer-Zählkammer mikroskopiert. Die Zellzahl wurde auf 5 Mio/ml mit RPMI eingestellt.

Im nächsten Schritt wurden jeweils 600 µl dieser Zellsuspension in 1,5ml Reaktionsgefäße verteilt. Dazu wurden, außer bei der Kontrolle, je 0,6µl des im jeweiligen Versuchs verwendeten Inhibitors (Telmisartan oder Eprosartan) pipettiert, gut gemischt und für 15 Minuten in den Brutschrank gestellt. Die getrocknete Membran wurde in einer Petrischale mit RPMI ebenfalls in den Brutschank gelegt.
Nun konnte die Grundplatte mit je 28,5 µl pro Vertiefung gefüllt werden. Die Kontrolle enthielt ausschließlich RPMI. Die chemotaktischen Substanzen, RANTES und SDF-1α, wurden mit RPMI verdünnt (1 ml RPMI und 1 µl RANTES bzw. SDF-1α).

Auf die befüllte Grundplatte wurde die Membran mit der rauen Seite nach unten aufgelegt, gefolgt von der Gummidichtung und der festgeschraubten Deckplatte. In die Vertiefungen der Deckplatte wurden je 45,5 µl der präinkubierten Zellsuspensionen pipettiert. Die gefüllte Kammer inkubierte drei Stunden im Brutschrank bei 37℃. Während dieser Zeit fand die eigentliche Migration statt, d.h. die Zellen wanderten entlang des chemotaktischen Gradienten nach unten durch die Membran. Die raue Schicht auf der Unterseite der Membran erleichterte den Zellen das Anheften.
Nach der Inkubationsphase wurde die Membran 10 Minuten in Methanol fixiert. Zur Färbung wurde sie anschließend 1,5 Minuten in

Eosin und 3 Minuten in Thiazin gelegt und dann mit Aqua bidest gespült.
Mit der rauen Seite nach unten wurde die Membran danach auf einen mit 70 % Ethanol gereinigten Objektträger gelegt. Die obere glatte Seite wurde mit einem fusselfreien Papier (Kimwipes lite) abgewischt, wodurch Zellen, die auf der Membran waren aber nicht durchgewandert sind entfernt wurden.
Nachdem die Membran getrocknet war, wurde der Objektträger mit Eukitt und einem Deckglas eingedeckt.

Am nächsten Tag wurde die Migration unter dem Mikroskop bei 40-facher Vergrößerung ausgewertet. Die Vertiefung mit der gleichmäßigsten Zellverteilung wurde aus einer Dreierreihe ausgewählt und hiervon je fünf zufällig ausgewählte Blickfelder ausgezählt. Bestimmt wurde das Verhältnis von induzierter Migration zur Negativkontrolle.

2.2.3. Zellvitalität

Um sicherzustellen, dass die Migrationsergebnisse nicht aufgrund einer erhöhten Zelltodrate verfälscht waren, wurde eine Trypanblaufärbung zum Nachweis der Zellvitalität durchgeführt.
Dafür wurden je 15 µl Zellsuspension, die analog zum Versuchsansatz der Migration mit den Stimulantien bzw. Inhibitoren versetzt und drei Stunden im Brutschrank bei 37℃ inkubierten, mit 15 µl Trypanblau gemischt. Nach 30 Sekunden wurden die gefärbten Zellen in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Die vitalen Zellen mit intaktem Stoffwechsel waren in der Lage den blauen Farbstoff aus ihrem Zytoplasma auszuscheiden und erschienen daher farblos. Die toten Zellen waren im Gegensatz dazu blau gefärbt. Es wurde das Verhältnis von vitalen Zellen zur Gesamtzellzahl gebildet.

2.2.4. ICAM-3 Immunfluroeszenzfärbung

Am Vortag des Versuchs wurde die Kammer für die ICAM-3 Färbung in eine Petrischale mit Collagen I gelegt und über Nacht im Kühlschrank bei 4℃ gelagert, um eine Collagenbeschichtung zu e rhalten.

Am nächsten Tag wurden die isolierten CD4-positiven Lymphozyten bei 1200 RPM, 10 Minuten, RT herunterzentrifugiert und auf 300.000 Zellen pro 1 ml RPMI + 0,5 % humanes Serum eingestellt.

Jeweils 1 ml der Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Einer Probe wurde 10 µmol/l Telmisartan zugegeben und 15 Minuten bei 37℃ vorinkubiert.

Im nächsten Schritt wurde in die Proben 100 ng/ml SDF-1α pipettiert. Die Negativkontrolle bestand ausschließlich aus der Zellsuspension. Die Proben wurden in die 4-chamber-slides ausgesät und für weitere 30 Minuten bei 37℃ inkubiert.

Nach dieser Inkubationsphase wurde das Medium abgesaugt und der Objektträger für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und mit PBS gespült.

Danach wurde der 1. Antikörper, mouse anti-ICAM-3 (mit PBS verdünnt), zugegeben und für 45 Minuten in den Brutschrank bei 37℃ gestellt. Nach einem weiteren Waschschritt mit PBS wurde ein 2. Antikörper, goat anti-mouse cy3 (1:500 mit PBS verdünnt), zu der Probe pipettiert und nun für 30 Minuten in den Brutschrank gestellt. Da der Antikörper stark lichtempfindlich ist, wurde dieser Schritt im Dunkeln durchgeführt, wobei der Objektträger mit Alufolie abgedeckt wurde.

Der Objektträger wurde mit PBS gespült und einer DAPI-Färbung unterzogen, wobei er für 10 bis 15 Minuten bei 37℃ in eine Lösung aus 19,8 ml Methanol und 400 ml 5 µg/ml DAPI-Stammlösung gelegt wurde.

Nach einem Waschschritt mit PBS konnte der Objektträger mit Dako Cytomation Fluorescent Mounting Medium eingedeckt werden.
Unter dem Fluoreszenzmikroskop kann bei Zellen, die zur zielgerichteten Migration induziert wurden, eine ICAM-3-Translokation an den Uropod beobachtet werden.

2.2.5. Statistik

Die Ergebnisse dieser experimentellen Studie wurden als Mittelwert ± Standardabweichung (SEM) dargestellt. Die Unterschiede wurden mittels ONE-WAY ANOVA und nachfolgendem Duncan´s post-hoc-test untersucht. Ein p-Wert<0,05 wurde als signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1. Effekt von Telmisartan

3.1.1. SDF-1α-induzierte Migration

Es wurde der Effekt von Telmisartan auf die SDF-1α-induzierte Migration von CD4-positiven Lymphozyten untersucht. Die Zellen wurden 15 Minuten mit 0,1, 1, 10 µmol/l Telmisartan vorbehandelt. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit 100 ng/ml SDF-1α. Nach der dreistündigen Inkubationsphase in der Boyden-Kammer zeigt SDF-1α eine 4,5 ± 3,4fache Induktion im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Die Präinkubation von Telmisartan führte zu einer Inhibition der SDF-1α induzierten Migration. Die maximale Inhibition konnte mit 10 µM auf das 1,7 ± 0,7fache erreicht werden.

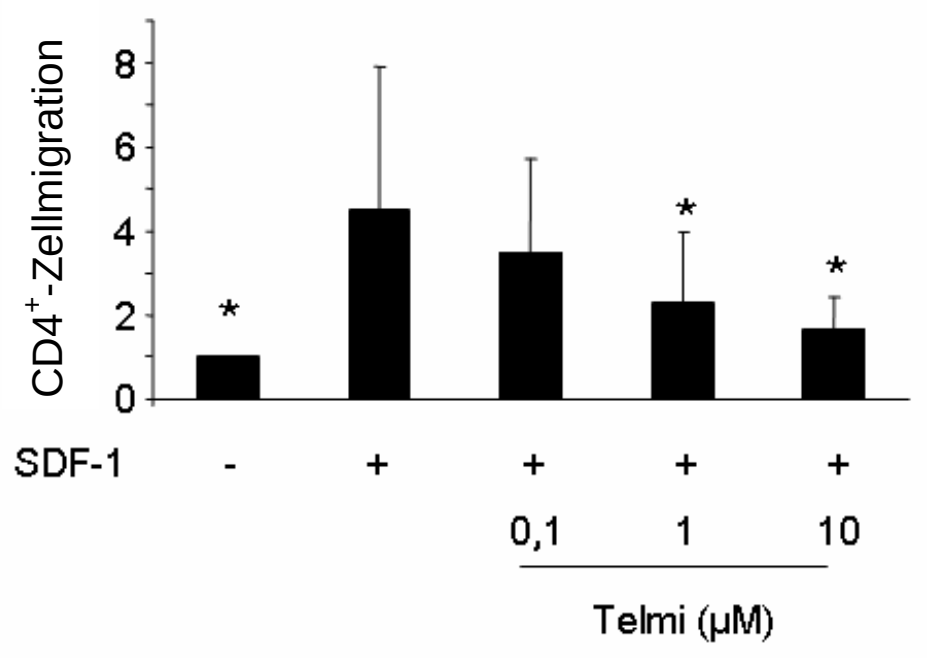

Abb. 4: Telmisartan (0,1; 1; 10 µM) hemmt konzentrationsabhängig die Stromal cell-Derived Factor-1Alpha [SDF-1α] -induzierte Migration humaner Cluster of Differentiation 4- [CD4] positiver Zellen. Die Lymphozyten wurden 15 Minuten mit Telmisartan vorinkubiert.
n =17; ∗<0,05; Säulen zeigen Mittelwert ± Standardabweichung

3.1.2. RANTES-induzierte Migration

Derselbe Versuch wurde mit RANTES, anstelle von SDF-1α durchgeführt. Die mit 100 pg/ml RANTES stimulierten Zellen zeigten nach einer dreistündigen Inkubationsphase eine Induktion der Migration auf das 2,1 ± 0,9fache. Die maximale Inhibition konnte auch hier mit 10 µM Telmisartan auf das 0,8 ± 0,4fache erreicht werden.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass der Effekt von Telmisartan unabhängig vom induzierten Stimulus ist.

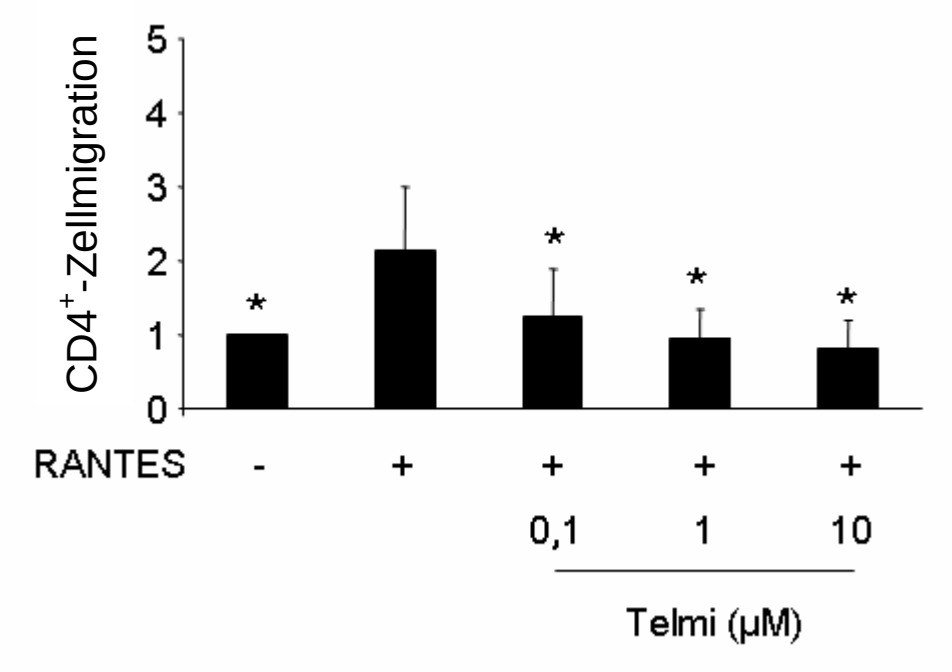

Abb. 5: Telmisartan (0,1; 1; 10 µM) hemmt konzentrationsabhängig die Regulated on Activation, normal T cell expressed and secreted- [RANTES] induzierte Migration humaner Cluster of Differentiation 4-[CD4] positiver Zellen. Die Lymphozyten wurden 15 Minuten mit Telmisartan vorinkubiert.

n =17; ∗<0,05; Säulen zeigen Mittelwert ± Standardabweichung

3.2. Effekt von Eprosartan auf die chemokininduzierte Migration

Nun wurde der Effekt von Eprosartan, einem nicht-PPAR-γ-aktivierenden Angiotensin-II-Rezeptorantagonist, auf die zielgerichtete Migration untersucht. Im Gegensatz zu 10 µmol/l Telmisartan konnte durch Zugabe von Eprosartan keine Hemmung der chemokininduzierten Migration festgestellt werden. Die Induktion war bei Verwendung von 100 µM Eprosartan mit 1,9 ± 0,2 ähnlich der stimulierten Kontrollgruppe. Telmisartan zeigte eine komplette Inhibierung der SDF-1α-induzierten Migration auf das 1,0 ± 0,1fache.

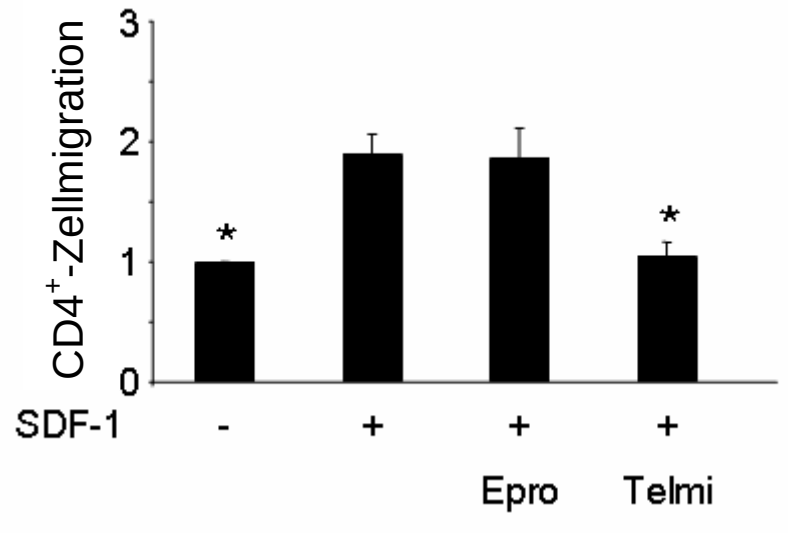

Abb.6: Eprosartan (100 µM) zeigt im Vergleich zu Telmisartan (10 µM) keine Hemmung der Stromal cell-Derived Factor-1Alpha- [SDF-1α] induzierten Migration humaner Cluster of Differentiation 4- [CD4] positiver Zellen. Lymphozyten wurden 15 Minuten mit Eprosartan oder Telmisartan vorbehandelt.
n=5; ∗<0,05; Säulen zeigen Mittelwert ± Standardabweichung

3.3. Effekt von Telmisartan bei Vorbehandlung mit Eprosartan

Es wurde der Einfluss von Telmisartan auf Lymphozyten, die mit Eprosartan vorbehandelt wurden und dann mit SDF-1α stimuliert wurden, untersucht. Die Vorbehandlung mit Eprosartan wurde durchgeführt, um sicherzustellen, dass der gezeigte Effekt von Telmisartan AT-II-rezeptorunabhängig ist. Der AT-II-Rezeptor wurde beim Kontakt mit Eprosartan blockiert, so dass das später zugegebene Telmisartan seinen Effekt über einen anderen Rezeptor ausüben muss.

Hierzu wurden die CD4-positiven Zellen 15 Minuten mit 100 µM Eprosartan vorbehandelt und anschließend mit 10 µmol/l Telmisartan stimuliert. Im Vergleich zu nur mit Eprosartan behandelten Zellen, konnte eine Hemmung 10 µmol/l Telmisartan gezeigt werden. Telmisartan hat also auch nach der Einwirkung von Eprosartan einen Effekt auf die Migration der CD4-positiven Zellen.

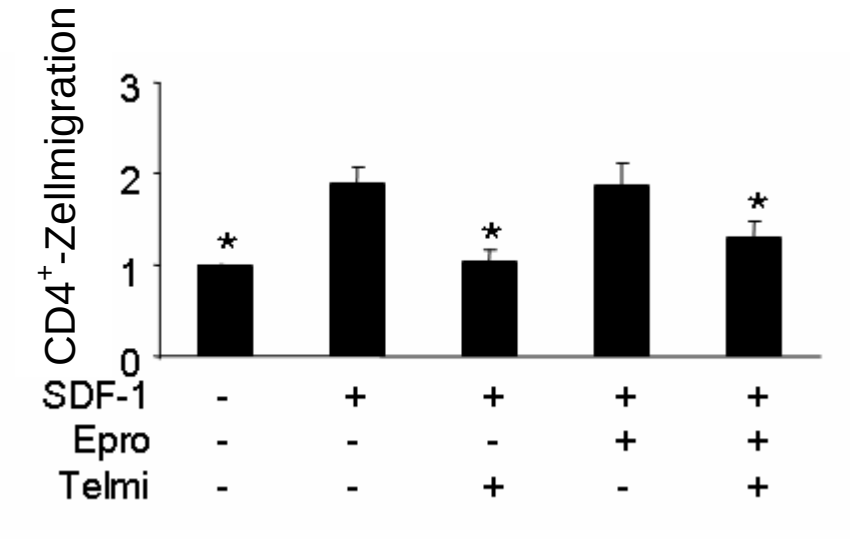

Abb. 7: Telmisartan (10 µM) hemmt die Stromal cell-Derived Factor-1Alpha- [SDF-1α] induzierte Migration humaner Cluster of Differentiation 4- [CD4] positiver Zellen im Vergleich zu Eprosartan. Telmisartan hemmt die Migration auch bei Eprosartan (100 µM) vorbehandelten Lymphozyten. Die Vorinkubationszeit betrug 15 Minuten.

n =5; ∗<0,05; Säulen zeigen Mittelwert ± Standardabweichung

3.4. Vitalität

Es wurde eine Vitalitätsfärbung mit Trypanblau durchgeführt, um nachzuweisen, dass die gesehenen Ergebnisse nicht durch eine erhöhte Zelltodrate während der Migration verursacht sind.

Die CD4-positiven Zellen wurden wie bei den Migrationsversuchen behandelt und nach einer dreistündigen Inkubation untersucht. Es zeigte sich im Versuch, dass nach dieser Inkubationsphase jeweils mehr als 92,4 % der Zellen vital sind, die Zellen also nicht durch den Einfluss der Stimulantien und Inhibitoren sterben.

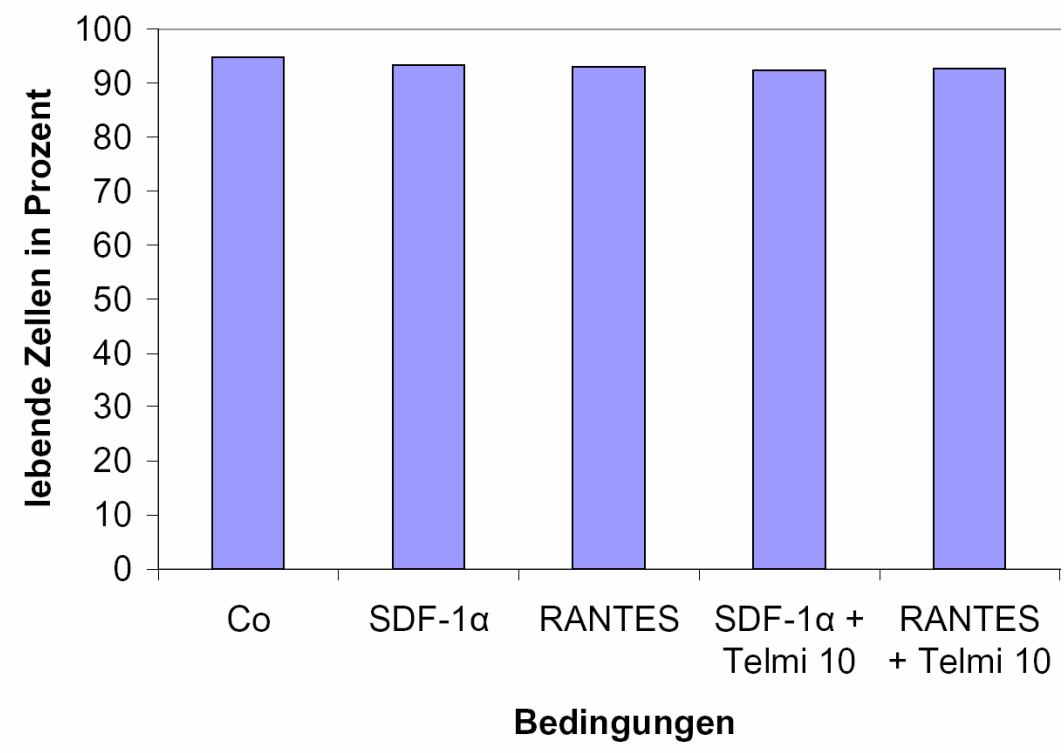

Abb.8: Die Vitalitätsfärbungen zeigen bei der Kontrolle [Co], Stromal cell-Derived Factor - 1 Alpha [SDF-1α], Regulated on Activation, normal T cell Expressed and Secreted [RANTES], SDF-1α + Telmisartan 10 µl [SDF-1α + Telmi 10] und RANTES + Telmisartan 10 µl [RANTES + Telmi 10] ähnlich hohe Prozentzahlen lebender Cluster of Differentiation 4 - [CD4] positiver Zellen.
n=3

3.5. ICAM-3-Färbung

Ein weiterer Nachweis von migrierenden Zellen ist die ICAM-3-Translokation an den Uropod. Der hier gebildete Quotient aus den ICAM-3-Translokationpositiven Zellen und der Gesamtzellzahl zeigt, wie viele Zellen durch die Stimulation migrieren.

Die CD4-positiven Zellen, die mit SDF-1α für 30 Minuten inkubiert wurden, zeigen zu 54,7 ± 10,5 % eine Zellmembranveränderung in Folge einer ICAM3-Translokation, was anhand der ICAM-3-Färbung unter dem Fluoreszenzmikroskop im Vergleich zur DAPI-Färbung sichtbar wird. Wenn die Zellen 15 Minuten mit 10 µM Telmisartan vorbehandelt wurden, sinkt dieser Wert auf 33,2 ± 7,3 %. Telmisartan hemmt in diesem Versuch die ICAM3-Translokation der CD4-positiven Lymphozyten.

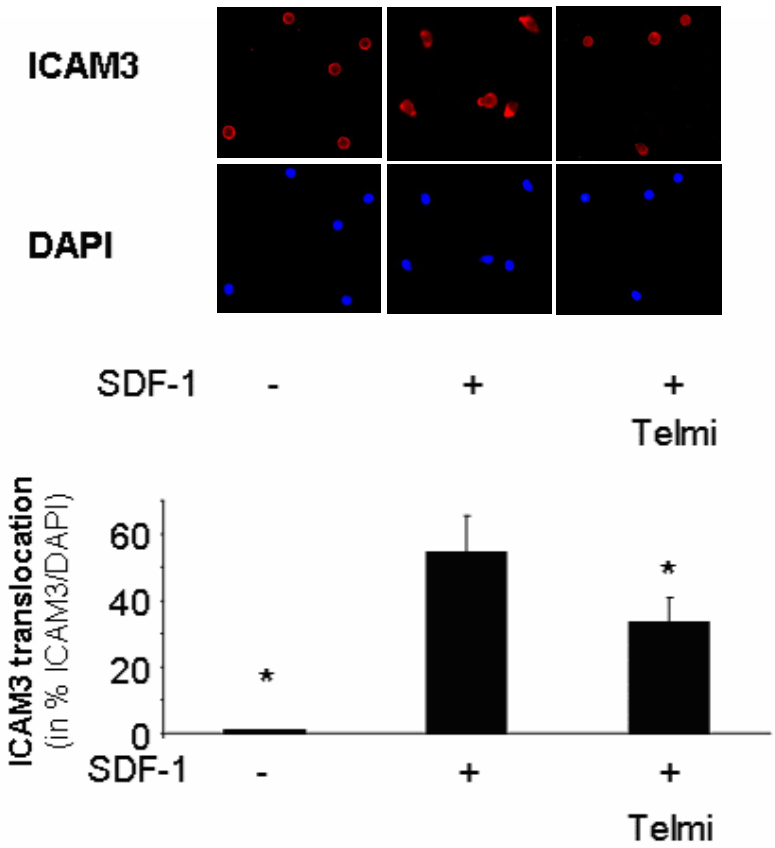

Abb.9: Oben: Zellen mit Intercellular adhesion molecule- [ICAM3] bzw. 4´,6-Diamidino-2-phenylolole- [DAPI] Färbung im Fluoreszenzmikroskop.

Unten: Telmisartan (10 µM) hemmt die Stromal cell-Derived Factor-1Alpha- [SDF-1α] induzierte Translokation von ICAM-3 in humanen Cluster of Differentiation- [CD4] positiven Zellen. Die Vorinkubationszeit betrug 15 Minuten.

n =5; ∗<0,05; Säulen zeigen Mittelwert ± Standardabweichung

Die Vorbehandlung von Eprosartan (100 µM) führt zu keiner Veränderung der SDF-1α-induzierten ICAM-3 Translokation. Bei einer Vorstimulation mit 100 µM Eprosartan und Verwendung von 10 µM Telmisartan sind nur noch 24,3 ± 2,1 % der Zellen verändert. Auch im ICAM-3-Staining konnte eine Hemmung der Migrationsbereitschaft der CD4-positiven Lymphozyten unter Vorbehandlung mit Telmisartan beobachtet werden.

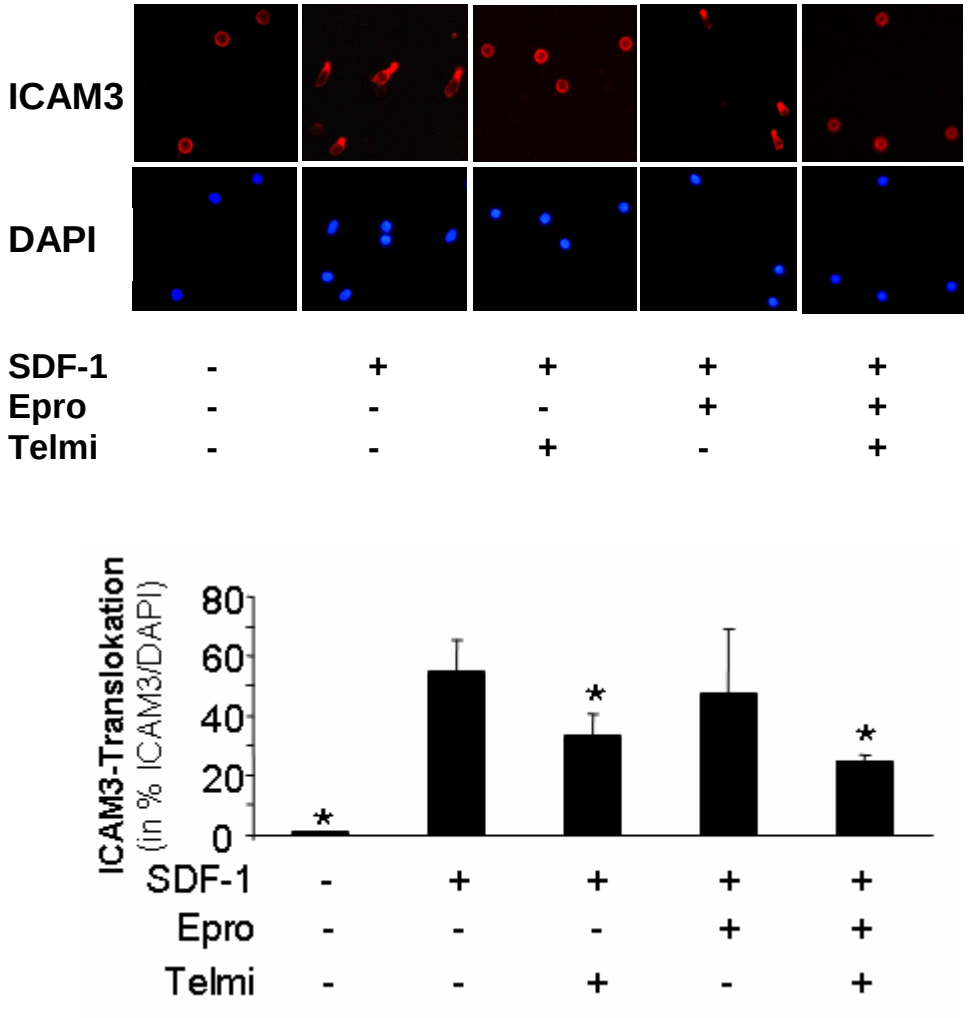

Abb.10:Oben: Zellen mit Intercellular adhesion molecue- [ICAM3] bzw. 4´,6-Diamidino-2-phenylolole- [DAPI]-Färbung im Fluoreszenzmikroskop.

Unten: Telmisartan (10 µM) hemmt im Vergleich zu Eprosartan (100 µl) die Stromal cell-Derived Factor-1Alpha- [SDF-1α] induzierte Translokation von ICAM-3 in humanen Cluster of Differentiation 4- [CD4] positiven Zellen. Dieser Effekt ist auch bei Vorbehandlung von Eprosartan (100 µM) zu sehen. Die Vorinkubationszeit betrug 15 Minuten.

n =5; ∗<0,05; Säulen zeigen Mittelwert ± Standardabweichung

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersuchte den Einfluss von Telmisartan auf die Migration CD4-positiver Lymphozyten. Die Ergebnisse zeigen, dass die durch SDF-1α bzw. RANTES induzierte Migration durch Telmisartan gehemmt wird. Dieser Effekt wird unabhängig vom AT-II-Rezeptor, am ehesten über Peroxisome proliferator-activated receptor-γ [PPAR-γ] vermittelt.

Die gewonnenen Daten legen nahe, dass Telmisartan durch die verminderte T4-Zellmigration die Atherogenese positiv beeinflussen könnte.

4.1. Telmisartan als PPAR-γ-Aktivator

Telmisartan, ein Angiotensin-II-Rezeptorantagonist, ist auch ein Partialagonist von Peroxisome proliferator-activated receptor-γ [PPARγ] und beeinflusst daher die Expression von Genen, die zum Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel gehören. [8] Diese Eigenschaft tritt schon bei einer Dosis auf, die oral zur Antihypertoniebehandlung eingenommen wird. [20]

In vitro Daten der letzten Jahre konnten zeigen, dass PPAR-γ außer von Adipozyten, Hepatozyten, Fibroblasten, Myozyten, Makrophagen und Monozyten auch von T-Lymphozyten exprimiert wird. [12,28]

Es ist bekannt, dass PPAR-γ-Aktivatoren, wie Pioglitazon und Rosiglitazon, die Entzündungsreaktion durch Reduktion der Zytokin-expression in T-Lymphozyten vermindern. [28] Dennoch wurde bisher noch nicht der Effekt der PPARγ-Aktivatoren auf die Migration untersucht.

Kintscher et al untersuchte bereits die Migrationsbereitschaft von Monozyten unter dem Einfluss von PPAR-γ-aktivierenden

Thiazolidinedionen. Hierbei zeigte sich, dass durch Glitazone die Migration von Monozyten vermindert wurde. [19]
In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der Teilagonist von PPAR-γ Telmisartan konzentrationsabhängig die T4-Zellmigration hemmt. Dieser Effekt kann nicht auf ein Absterben der Lymphozyten zurückgeführt werden, da die Vitalität der Zellen nicht beeinflusst wurde.
Die verwendeten Konzentrationen von Telmisartan waren zwischen 0,1 µmol/l und 10 µmol/l. Die höchste Hemmung der SDF-1α- und RANTES-induzierten Migration konnte bei 10 µmol/l festgestellt werden. Diese Konzentration von Telmisartan wurde auch in anderen Studien, wie von der Arbeitsgruppe Schupp et al verwendet, um die Aktivität von PPAR-γ nachzuweisen. [13,44,45]

Alle gezeigten Effekte sind unabhängig vom chemotaktischen Stimulus, da für alle Versuche zwei verschieden wirkende Stimulantien, nämlich SDF-1α und RANTES, zur Induktion der Migration verwendet wurden. SDF-1α, ein starker T-Zellstimulus, wirkt über mitogen-aktivierende Proteinkinasen [MAP]. RANTES aktiviert die T-Lymphozyten über Bindung an verschiedene G-Proteingekoppelte Rezeptoren und induziert dadurch die Zellpolarisation und Chemotaxis. [10]
Die hier verwendeten Konzentrationen für SDF-1α und RANTES wurden bereits von anderen Arbeitsgruppen bei Versuchen mit T-Lymphozyten verwendet. [10,38,48]

Des Weiteren hatten die Versuche keinen Einfluss auf die Expression der jeweiligen Rezeptoren. Die Arbeitsgruppe hat in parallelen Versuchen herausgefunden, dass Telmisartan keinen Effekt auf die PPAR-γ-Expression hat, wodurch die Ergebnisse unabhängig von der

Rezeptorzahl waren und deshalb eine Folge des intrazellulären Signalwegs sein müssen.
In der SDF-1α- und RANTES-induzierten Migration kommt es zur ICAM-3-Translokation an den Uropod der Zellen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Telmisartan die ICAM-3-Translokation inhibiert. Die Hemmung der Migration konnte jeweils in den Migrationsversuchen, als auch dem ICAM3-Staining nachgewiesen werden.

4.2. ATII-rezeptorunabhängige Effekte von Telmisartan

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand von zwei Versuchen gezeigt, dass Telmisartan die Migration CD4-positiver Lymphozyten unabhängig vom Angiotensin-II-Rezeptor über PPAR-γ hemmt.
Zuerst wurde der Effekt von Eprosartan auf Lymphozytenmigration untersucht. Eprosartan ist auch ein Angiotensin-II-Rezeptorblocker, hat aber keinen Einfluss auf die PPAR-γ-Aktivität. [44] Es konnte keine Hemmung der SDF-1α-stimulierten Migrationsversuche festgestellt werden. Es wurde eine Konzentration von 100 µmol/l verwendet. Bei einer anderen Studie, in der Eprosartan als nicht PPAR-γ-aktivierender Angiotensin-II-Rezeptorblocker verwendet wurde, wurde sogar mit einer geringeren Konzentration von 10 µmol/l gearbeitet. [13]

Außerdem hat eine Blockade des Angiotensin-II-Rezeptors durch eine hohe Konzentration von Eprosartan keinen Einfluss auf die nachfolgende lymphozytenmigrationshemmende Wirkung des Telmisartans.
Aus diesen zwei Gründen kann davon ausgegangen werden, dass Telmisartan die CD4-positive Lymphozytenmigration unabhängig vom AT-II-Rezeptor beeinflusst.

4.3. Effekt auf Arteriosklerose

Frühere Studien haben gezeigt, dass bei der Atherogenese die Einwanderung von Makrophagen und T-Lymphozyten eine wichtige Rolle spielt. Es wird davon ausgegangen, dass dieser Effekt über Signalwege durch Chemokine reguliert wird und diese Rezeptoren einen Ansatzpunkt für die Arteriosklerosebehandlung darstellen könnten. Durch Blockade dieser Rezeptoren, wie CXCR3 auf den T-Helferzellen, konnte die T-Lymphozytenmigration und dadurch die frühe Phase der Arteriosklerose beeinflusst werden. [50]
Die meisten Studien führen diesen Effekt der T-Lymphozyten auf Chemokine, die in der Gefäßwand exprimert werden und die Arteriosklerose modulieren, zurück. Die Hemmung der Migration CD4-positiver Lymphozyten und den daraus resultierenden positiven Effekt auf die Arteriosklerose wurde bisher noch nicht untersucht.

PPAR-γ wird von vaskulären Zellen, wie Endothelzellen, Vascular smooth muscle cells [VSMCs], Makrophagen und T-Lymphozyten exprimiert. Studien zeigen bereits, dass PPAR-γ-Aktivatoren die Migration der VSMCs hemmen, die Freisetzung von matrixbildenden Enzymen vermindern und die Angiotensin-II-Rezeptoren herunter reguliert werden. [29]
Durch die Verminderung der Lymphozytenmigration kann die Atherogenese in einem kritischen Punkt beeinflusst werden. [52]

4.4. Klinische Ausblicke

Bereits frühere Arbeiten haben gezeigt, dass PPAR-γ eine wichtige Rolle bei der Regulation der Insulinsensitivität spielt und durch verschiedene Liganden, wie Glitazone oder Prostaglandine, aktiviert werden kann. [44]

Außerdem konnte gezeigt werden, dass PPAR-γ-Aktivatoren anti-inflammatorische, antioxidative und antiproliferative Effekte auf Gefäßwandzellen ausüben, was zu einer Reduktion der Arteriosklerosebildung führt. [55]
Telmisartan, ein bifunktionales Molekül, müsste sowohl die hämodynamischen als auch die biochemischen Merkmale des metabolischen Syndroms positiv beeinflussen können und hätte daher einen größeren Einfluss bei der präventiven Behandlung der Arteriosklerose und den kardiovaskulären Risikofaktoren als andere Antihypertensiva. [8] Vor allem Patienten, die unter Hypertonie kombiniert mit anderen kardiovaskulären Risikofaktoren, wie Diabetes mellitus Typ II, leiden, profitieren von diesem Effekt. [51] Die meisten Antihypertensiva senken den Bluthochdruck ohne auf das metabolische Syndrom Einfluss zu nehmen. [20]

Es ist bereits nachgewiesen dass, Glitazone bei den behandelten Patienten zu einer signifikanten Reduktion des CRPs und anderen inflammatorischen Parametern wie TNF-α führt und diese Stoffgruppe einen positiven Effekt auf das metabolische Syndrom durch Verbesserung der Insulinsensitivität ausübt. [31]
Ein weiterer bekannter Effekt der PPAR-γ-Aktivatoren ist die Stabilisation von fortgeschrittener atherosklerotischer Plaque zur Vorbeugung von Plaquerupturen und der daher resultierenden Inzidenzverminderung des akuten Koronarsyndroms. [34] Außerdem wird nach koronarer Stentimplantation unter Therapie mit Glitazonen eine verminderte Neubildung der Intima beobachtet, wodurch geringere Restenoseraten erklärt werden. [32]

Es kann nun in weiteren klinischen und experimentellen Studien untersucht werden, ob Telmisartan über PPAR-γ die Effekte von Glitazonen besitzt.

Die Verminderung der Lymphozytenmigration wäre ein weiterer Ansatzpunkt zur Hemmung der Arteriosklerosebildung in einem frühen Stadium. Telmisartan hat über PPAR-γ einen antientzündlichen Effekt auf die Zellen der Gefäßwand, wie es zuvor bereits bei den Glitazonen bekannt war.

In weiteren Studien muss nun geklärt werden, ob dieser von Telmisartan über PPAR-γ ausgeübte Effekt auch im Tiermodel zu einer Reduktion der Einwanderung der T-Lymphozyten und dadurch zu einer verminderten Entzündungsreaktion und schließlich zu weniger Arteriosklerosebildung führt.

Dieser Effekt könnte dann die Atherogenese in einem sehr frühen Stadium positiv beeinflussen.

5. Zusammenfassung

Die Arteriosklerose wird in den letzten Jahren zunehmend als inflammatorische Erkrankung angesehen.
Die in die Gefäßwand einwandernden Entzündungszellen, wie T-Lymphozyten, können durch Aktivierung des Peroxisome proliferator-activated receptors-γ [PPAR-γ] reguliert werden.

In dieser Arbeit konnte eine konzentrationsabhängige Hemmung der durch Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted [RANTES] und Stromal cell Derived Factor - 1 Alpha [SDF-1α] induzierten Migration humaner Cluster of Differentiation 4- [CD4-] positiver Lymphozyten durch Telmisartan, ein Angiotensin-II-Rezeptor-blocker mit PPAR-γ-aktivierender Eigenschaft gezeigt werden.
Die Versuche wurden anhand von CD4-positiven Lymphozyten-zellsuspensionen, die abhängig von chemotaktischen Substanzen eine Polycarbonatmembran in einer Migrationskammer durchwanderten, durchgeführt. Des Weiteren wurde an stimulierten CD4-positiven Lymphozyten eine Intercellular adhesion molecule-3- [ICAM] Trans-lokation unter dem Fluoreszenzmikroskop gezeigt.
Der gezeigte Effekt konnte nicht mit Eprosartan, einem Angiotensin-II-Rezeptorblocker ohne PPAR-γ-aktivierender Eigenschaft, hervor-gerufen werden. Telmisartan dagegen hat die Hemmung auch nach einer Vorbehandlung mit Eprosartan beibehalten.
Dies zeigt, dass Telmisartan unabhängig vom AT-II-Rezeptor eine migrationshemmende Wirkung auf CD4-positive Lymphozyten. Dieser Effekt ist am ehesten über PPAR-γ vermittelt. Die Zellvitalität blieb in allen Versuchen unbeeinflusst.

Auch andere Studien haben in den letzten Jahren über eine Hemmung der Einwanderung inflammatorischer Zellen in die Gefäßwand eine Verminderung der Atherogenese gezeigt.

In unseren Experimenten konnten wir zeigen, dass Telmisartan die Migration CD4-positiver Lymphozyten vermindert.

In weiteren Studien kann nun die modulatorische Wirkung von Telmisartan auf die Atherogenese im menschlichen Körper untersucht werden.

6. Literaturverzeichnis

[1] Altman R: Risk factors in coronary atherosclerosis athero-inflammation: the meeting point. Thromb J. I: 4 (2003)

[2] Andrian von UH, Mackay CR: T-Cell Function and Migration – Two Sides of the Same Coin. N Engl J Med. 343: 1020-1034 (2000)

[3] Angeli V, Hammad H, Staels B, Capron M, Lambrecht BN, Trottein F: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Inhibits the Migration of Dentritic Cells: Consequences for the Immune Response. J Immunol. 170: 5295-5301 (2003)

[4] Asmar R: Targeting effective blood pressure control with angiotensin receptor blockers. Int J Clin Pract. 60: 315-320 (2006)

[5] Barnett AH, Bain SC, Bouter P, Karlberg B, Madsbad S, Jervell J, Mustonen J: Angiotensin-Receptor Blockade versus Converting-Enzyme Inhibition in Typ 2 Diabetes and Nephropathy. N Engl J Med. 351: 1952-1961 (2004)

[6] Barnett AH: Preventing renal complications in diabetic patients: the Diabetics Exposed to Telmisartan And Enalapril (DETAIL) study. Acta Diabetol. 42: 42-49 (2005)

[7] Battershill AJ, Scott LJ: Telmisartan: a review of its use in the management of hypertension. Drugs 66: 51-83 (2006)

[8] Benson CS, Pershadsingh HA, Ho CI, Chittiboyina A, Desai P, Pravenec M, Qi N, Wang J, Avery MA, Kurtz TW: Identification of Telmisartan as a Unique Angiotensin II Receptor Antagonist With Selective PPARγ-Modulating Activity. Hypertension 43:993 (2004)

[9] Brasier AR, Recinos A, Eledrisi MS: Vascular Inflammation and the Renin-Angiotensin System. Arteriosc Thromb Vasc Biol. 22: 1257-1266 (2002)

[10] Brill A, Hershkoviz R, Vaday GG, Chowers Y, Lider O: Augmentation of RANTES-Induced Extracellular Signal-Regulated Kinase Mediated Signaling and T Cell Adhesion by Elastase-Treated Fibronectin. J Immunol. 166: 7121-7127 (2001)

[11] Burnier M, Brunner HR: Angiotensin II receptor antagonists in hypertension. Kidney Int. 54: 107-111 (1998)

[12] Clark RB, Bishop-Bailey D, Estrada-Hernandez T, Hla T, Puddington L, Padula SJ: The Nuclear Receptor PPARγ and Immunoregulation: PPARγ Mediates Inhibition of Helper T Cell Responses. J Immunol. 164: 1364-1371 (2000)

[13] Clasen R, Schupp M, Foryst-Ludwig A, Sprang C, Clemenz M, Krikov M, Thöne-Reineke C, Unger T, Kintscher U: PPARγ-Activating Angiotensin Type-1 Receptor Blockers Induce Adiponectin. Hypertension 46: 137-143 (2005)

[14] Fan J, Watanabe T: Inflammatory Reactions in the Pathogenesis of Atherosclerosis. J Atheroscler Thromb. 10: 63-71 (2003)

[15] Ferrario CM, Strawn WB: Role of the Renin-Angiotensin-Aldosteron System and Proinflammatory Mediators in Cardiovascular Disease. Am J Cardiol. 98: 121-128 (2006)

[16] Giles T: Relevance of blood pressure variation in the circadian onset of cardiovascular events. J Hypertens Suppl. 23: 35-39 (2005)

[17] Greven J, Knobloch von R, Lübbecke F: Pharmaka mit Einfluss auf die Nieren, den Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalt. In: Estler CJ, Schmidt H (Hrsg) Pharmakologie und Toxikologie. 6. Auflage, Schattauer Stuttgart, New York, S.549-596 (2007)

[18] Kawai T, Seki M, Hiromatsu K, Eastcott JW, Watts GFM, Sugai M, Smith DJ, Porcelli SA, Taubman MA: Selective Diapedesis of Th1 Cells Induced by Endothelial Cell RANTES. J Immunol. 163: 3269-3278 (1999)

[19] Kintscher U, Goetz S, Wakino S, Kim S, Nagpal S, Chandraratna RAS, Graf K, Fleck E, Hsueh WA, Law RE: Peroxisome proliferator-activated receptor and retinoid X receptor ligands inhibit monocyte chemotactic protein-1-directed migration of monocytes. Eur J Pharmacol. 401: 259-270 (2000)

[20] Kurtz TW: Treating the metabolic syndrome: telmisartan as a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activator. Acta Diabetol. 42: 9-16 (2005)

[21] Laufs U: Koronarkreislauf. In: Siegenthaler W, Blum HE (Hrsg) Klinische Pathophysiologie. 9. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, S. 620-627 (2006)

[22] Libby P: Molecular Bases of the Acute Coronary Syndromes. Circulation 91: 2844-2850 (1995)

[23] Libby P: Arteriosklerose als Entzündung. Spektrum der Wissenschaft 3: 11-19 (2003)

[24] Libby P: Pathogenese der Atherosklerose. In: Dietel M, Suttorp N, Zeitz M (Hrsg) Harrisons Innere Medizin. 16. Auflage, McGraw-Hill und ABW Wissenschaftsverlag, Berlin, S. 1528-1532 (2005)

[25] Maillard MP, Perregaux C, Centeno C, Stangier J, Wienen W, Brunner HR, Burnier M: In Vitro and in Vivo Characterization of the Activity of Telmisartan: An Insurmountable Angiotensin II Receptor Antagonist. J Pharmacol Exp Ther. 302: 1089-1095 (2002)

[26] Marx N, Hombach V: Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in der Gefäßwand – neue Regulatoren der Genexpression in vaskulären Zellen. Z Kardiol. 90: 470-477 (2001)

[27] Marx N: Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ and Atherosclerosis. Curr Hypertens Rep. 4: 71-77 (2002)

[28] Marx N, Kehrle B, Kohlhammer K, Grüb M, Koenig W, Hombach V, Libby P, Plutzky J: PPAR Activators as Antiinflammatory Mediators in Human T Lymphocytes. Circ Res. 90: 703-710. (2002)

[29] Marx N, Duez H, Fruchart JC, Staels B: Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Atherogenesis: Regulators of Gene Expression in Vascular Cells. Circ Res. 94: 1168-1178 (2004)

[30] Marx N: Pathophysiologie der Atherosklerose bei Diabetes mellitus. Der Diabetologe 1: 84-90 (2005)

[31] Marx N: Vaskuläre Effekte von Glitazonen. Cardio Vasc. 5 (2005)

[32] Marx N, Wöhrle J, Nusser T, Walcher D, Rinker A, Hombach V, Koenig W, Höher M: Pioglitazone Reduces Neointima Volume After Coronary Stent Implantation: A Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Trial in Nondiabetic Patients. Circulation 112: 2792-2798 (2005)

[33] Masche UP: Telmisartan. Pharma-Kritik. (2000)

[34] Meisner F, Walcher D, Gizard F, Kapfer X, Huber R, Noak A, Sunder-Plassmann L, Bach H, Haug C, Bachem M, Stojakovic T, März W, Hombach V, Koenig W, Staels B, Marx N: Effect of Rosiglitazone Treatment on Plaque Inflammation and Collagen Content in Nondiabetic Patients: Data From a Randomized Placebo-Controlled Trial. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 26: 845-850 (2006)

[35] Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M: Mutschler Arzneimittelwirkungen. 8. Auflage, Wissenschaftlicher Verlag mgH Stuttgart, S.524-596 (2001)

[36] Neutel JM, Kolloch RE, Plouin PF, Meinicke TW, Schumacher H: Telmisartan vs losartan plus hydrochlorothiazide in the treatment of mild-to-moderate essential hypertension – a randomised ABPM study. J Hum Hypertens. 17: 569-575 (2003)

[37] Oka K, Chan L: Inhibition and regression of atherosclerotic lesions. Acta Biochim Pol: 52(2):311-319 (2005)

[38] Pelletier AJ, Laan van der LJW, Hildbrand P, Siani MA, Thompson DA, Dawson PE, Torbett BE, Salomon DR: Presentation of chemokine SDF-1α by fibronectin mediates directed migration of T cells. Blood 96: 2682-2690 (2000)

[39] Pershadsingh HA: Treating the metabolic syndrome using angiotensin receptor antagonists that selectively modulate peroxisome proliferator-activated receptor-γ. Int J Biochem Cell Biol. 38: 766-781 (2005)

[40] Pichler WJ, Peter HH: Immunsystem. In: Siegenthaler W, Blum HE (Hrsg) Klinische Pathophysiologie. 9. Auflage, Thieme Stuttgart, New York, S. 480-552 (2006)

[41] Raquel D, Mahtab J: Angiotensin II-receptor antagonists: An overview. Am J Health Syst Pharm 57: 1231-1241 (2000)

[42] Roessner A, Schneider I, Kirkpatrick CJ, Böcker W: Gefäße. In: Böcker W, Denk H, Heitz PU (Hrsg) Pathologie. Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore

[43] Ross R: Atherosclerosis - An Inflammatory Disease. N Engl J Med. 340:115-126 (1999)

[44] Schupp M, Janke J, Clasen R, Unger T, Kintscher U: Angiotensin Typ 1 Receptor Blockers Induce Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ Activity. Circulation 109: 2054-2057. (2004)

[45] Schupp M, Clemenz M, Gineste R, Witt H, Janke J, Helleboid S, Hennuyer N, Ruiz P, Unger T, Staels B, Kintscher U: Molecular Characterization of New Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Modulators With Angiotensin Receptor Blocking Activity. Diabetes 54: 3442-3452 (2005)

[46] Serrador JM, Alonso-Lebrero JL, Pozo del MA, Furthmayr H, Schwartz-Albiez R, Calvo J, Lozano F, Sánchez-Madrid F: Moesin Interacts with the Cytoplasmic Region of Intercellular Adhesion Molecule-3 and Is Redistributed to the Uropod of T Lymphocytes during Cell Polarization. J Cell Biol. 138:1409-1423 (1997)

[47] Serrador JM, Nieto M, Sánchez-Madrid F: Cytoskeletal rearrangement during migration and activation of T lymphocytes. Trends Cell Biol. 9: 228-233 (1999)

[48] Siragy HM: The role of AT2 receptor in hypertension. Am J Hypertens. 13: 62-67 (2000)

[49] Sotsios Y, Whittaker GC, Westwick J, Ward SG: The CXC Chemokine Stromal Cell-Derived Factor Activates a G_i-Coupled Phosphoinositide 3-Kinase in T Lymphocytes. J Immunol. 163: 5954-5963 (1999)

[50] Veillard NR, Steffens S, Pelli G, Lu , Kwak BR, Craig G, Charo IF, Mach F: Differential Influence of Chemokine Receptors CCR2 and CXCR3 in Development of Atherosclerosis In Vivo. Circulation 112: 870-878 (2005)

[51] Vitale C, Mercuro G, Castiglioni C, Cornoldi A, Tulli A, Fini M, Volterrani M, Rosano GMC: Metabolic effect of telmisartan and losartan in hypertensive patients with metabolic syndrome. Cardiovasc Diabetol. 4 (2005)

[52] Walcher D, Aleksic M, Jerg V, Hombach V, Zieske A, Homma S, Strong J, Marx N: C-Peptide Induces Chemotaxis of Human CD4-Positive Cells Involvement of Pertussis Toxin-Sensitive G-Proteins and Phosphoinositide 3-Kinase. Diabetes 53: 1664-1670 (2004)

[53] Welsch U: Lehrbuch, Histologie, S. 207-226, 2. Auflage, Urban & Fischer, München, Jena (2006)

[54] Wienen W, Entzeroth M, Meel van JCA: A review on telmisartan: a novel, long-acting angiotensin-II-receptor-antagonist. Cardiovasc Drug Rev. 18:127-156 (2000)

[55] Yamagishi S, Takeuchi M: Telmisartan is a promising cardiometabolic sartan due to is unique PPAR-γ-inducing property. Med Hypotheses. 64: 476-478 (2005)

Danksagung

Ich möchte mich ganz besonders bei Herrn Prof. Dr. Nikolaus Marx für die hervorragende Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit bedanken. Besonders hervorzuheben sind sowohl seine große Erfahrung im wissenschaftlichen Bereich, als auch sein persönliches Engagement, mit welchem er stets für einen guten Zusammenhalt im Labor sorgt.

Betz Susanne, Bach Helga, Durst Renate und Grüb Miriam möchte ich einen großen Dank für die technische Unterstützung, die zuverlässige Hilfe und die freundliche Atmosphäre im Labor aussprechen.
Herzlichen Dank auch an meinen Betreuer Dr. Walcher Daniel.

Des weiteren möchte ich mich bei meinem Bruder Hannes für die Unterstützung bei dem Kampf mit dem Computer und der Erstellung der Zeichnungen bedanken.

Ein besonderes Dankeschön geht an meinen Freund Haiko Kinzel und an meine Freundin Susanne Schraudolf, die die Arbeit nach Tipp- und Rechtschreibfehlern durchsucht haben.