Universitätsklinikum Ulm
Zentrum für Innere Medizin
Klinikum für Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Vinzent Hombach

Regulation der *Receptors for Advanced Glycation Endproducts* (RAGE) in humanen Endothelzellen durch PPARγ-aktivierende Glitazone

D I S S E R T A T I O N

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

vorgelegt von

Kirstin Rautzenberg
aus Böblingen

2008

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Nikolaus Marx
2. Berichterstatter:	PD Dr. Mathias Schmid
Tag der Promotion:	23. Oktober 2009

gewidmet Christiane Menz
für die gemeinsame Zeit in Ulm

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis **i**

Abkürzungsverzeichnis **iii**

1 Einleitung **1**

1.1 Arteriosklerose 1

1.2 Diabetes mellitus 4

1.3 Das AGE-RAGE-Konzept 6

1.4 Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) 8

1.5 Thiazolidindione 10

1.6 Fragestellung 14

2 Material und Methoden **15**

2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial 15

2.1.1 Zellkultur und Zellisolierung 15

2.1.2 Zellstimulation 17

2.1.3 FACS/Durchflußzytometrie 17

2.1.4 Western-Blots 17

2.2 Lösungen 19

2.2.1 Zellkultur und Zellisolierung 19
2.2.2 Western-Blots 19
2.3 Geräte 20
2.4 Methoden 21
2.4.1 Isolierung und Kultivierung von humanen Endothelzellen . . 21
2.4.2 Zellstimulation 23
2.4.3 FACS/Durchflußzytometer 23
2.4.4 Western-Blots 24

3 Ergebnisse **27**
3.1 FACS-Analysen 27
3.2 Western-Blots 29

4 Diskussion **34**
4.1 Bewertung der Effekte von molekularen Thiazolidindionen 34
4.2 Pathophysiologische Relevanz der Ergebnisse 39
4.3 Fazit und Ausblick für die Zukunft 43

5 Zusammenfassung **45**

Literaturverzeichnis **46**

Abbildungsverzeichnis **67**

Danksagung **68**

Lebenslauf **69**

Im Text verwendete Abkürzungen

a	je
AG	Arbeitsgemeinschaft
AGE	*advanced glycation endproduct*
AK	Antikörper
AL-294, -321	Forschungssubstanzen abgeleitet von Clofibrat, beziehungsweise Prototyp von Ciglitazon
ALT	Alaninaminotransferase
aqua ad	mit Wasser auffüllen
AP-1	aktivierendes Protein *activator-protein-1*
APS	Aminopersulfat
BMI	Body-Mass-Index
BPB	Bromphenolblau
BRL49653	Rosiglitazon-Testsubstanz
BSA	bovines Serumalbumin
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CODE-2	Studie *Cost of Diabetes in Europe for Type 2 Diabetes*
CYP_2C8, -C9	Zytochrome
DHA	*docosahexanoic acid*

DMEM	*Dulbeccos modified eagle medium*
DMSO	Dimethylsulphoxid
DNA	Deoxyribonucleinsäure
DR-1	*direct-repeat-1*-Sequenz
EBM	*endothelial cell basal medium*
EC	endothelial cell
ECGS	*endothelial cell growth supplement*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELAM	*endothelial leucozyte adhesion molecule*
ELISA	*enzyme-linked immunosorbent assay*
EMSA	*electrophoretic mobility shift assay*
Endothelin-1	vasoaktives Polypeptid
engl.	englisch
EPA	*eicosapentoic acid*
E-Selectin	*lectin cell adhesion molecules*
ETYA	*eicosatetranoic acid*
Fa.	Firma
FAAR	Fettsäure-aktivierter Rezeptor
FACS	*fluorescence-activated cell sorter/sorting*, synonym Durchflusszytometrie
FCS	fetales Kälberserum
FITC	*fluoresceinthiocyanat*
GMP-140	*granular membrane protein*, synonym P-Selektin
H_20	Wasser
HbA1c	glykolysiertes Hämoglobin-A_1 ($=\alpha_2\beta_2$)
HDL	*high density lipoprotein*
HODE	Hydroxyoctadecadiensäuren

HSVEC	*human saphena vain endothelial cell*, humane Endothelzellen aus der Vena saphena
ICAM	*intercellular adhesion molecule*
IFN-γ	Interferon-γ, Glycoprotein
Ig	Immunglobulin
IUPAC	*International Union of Pure and Applied Chemistry*, (deutsch: Internationale Union für reine und angewandte Chemie)
kD	Kilodalton
KHK	koronare Herzkrankheit
LDL	*low density lipoprotein*
LPS	Lipopolysaccharide (Endotoxine)
LXR	*Liver-x*-Rezeptor
MCP-1	*monocyte chemoattractant protein-1*
MMPs	Metalloproteinasen
Mrd.	Milliarden
N	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NF-κB	*nuclear-factor-κB*
NO	Stickstoffmonoxyd
NP 40	*nonyl-phenoxy polyethoxy ethanol 40*
NUC-1	*nuclear hormone receptor 1*
NYHA	*New York Heart Association classification*
ON	*over night*, (deutsch: über Nacht)
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
PBS	phosphatgepufferte Saline
PBST	phosphatgepufferte Saline mit TWEEN

Pio	Pioglitazon
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluoride
PPAR	*peroxisome proliferator-activated receptor*
15d-PGJ_2	15-deoxy-Prostaglandin-J_2
PPRE	*PPAR response element*
PROactive Studie	PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events
PS	Penicillin/Streptomycin
PUFA	*polyunsaturated fatty acid*
RAGE	*receptor for advanced glycation endproducts*
RAR	*retinoic acid receptor*
Rosi	Rosiglitazon
ROS	reaktive Sauerstoffradikale, auch synonym für oxidativen Stress
rpm	*revolutions per minute*
RT	Raumtemperatur
RXR	*retinoic x receptor*
SDS	*sodium dodecyl sulfate*
SMCs	*smooth muscle cells*, (deutsch: glatte Gefäßmuskelzellen)
SP-1	*specificy protein 1*, Transkriptionsfaktor
TF	*tissue factor*
TNF-α	Tumornekrose-Faktor-α
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TWEEN	Polyoxyethylene-sorbitan-monolaurate
TZDs	Thiazolidindione
U	*unit*
USA	*United States of America*
V	Volt
VCAM	*vascular cell adhesion molecule*

VDR	Vitamin-D-Rezeptor
VEGF	*vascular endothelial growth factor*
WHO	*World Health Organisation*
WY 14643	*4-chloro-6-(2,3-xylidino)-2-pyrimidinylthioacetic acid*

1 Einleitung

1.1 Arteriosklerose

Die Arteriosklerose ist mit Abstand die häufigste und bedeutendste Arterienerkrankung. Sie ist im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen noch immer die häufigste Todesursache der westlichen Industrieländer, was ihre weitreichende Bedeutung unterstreicht, beziehungsweise das große Forschungsinteresse an ihr erklärt. Nach heutiger Auffassung, die sich auf experimentelle und klinische Studien stützt, geht man davon aus, dass bei der Arteriosklerose eine chronisch progrediente, inflammatorische Läsion der Gefäßwand im Bereich der Intima von großer Bedeutung ist [111]. Ein komplexes Zusammenspiel multipler Faktoren, welche in einem konstanten Entzündungsprozeß münden.

Bezüglich der Entstehung der Arteriosklerose existieren zahlreiche Hypothesen. Das Endothel der Intima mit seiner semipermeablen Barriere besitzt zahlreiche Funktionen und hält im Gesunden ein empfindliches Gleichgewicht aus seiner antioxidativen Kapazität. Diese wird unter anderem aufrechterhalten durch die Superperoxid-Dismutase, Katelase, Glutathion-Reduktase, Gluthation und Vitamin C und dem ihr entgegenstehendem oxidativen Stress — dem so genannten ROS —, bestehend aus reaktiven Sauerstoffradikalen. Gewinnt nun der oxidative Stress durch das Auftreten von physikalischen (Scherkräfte), immunologischen

oder chemischen Stimuli die Überhand, kommt es zur endothelialen Dysfunktion, wodurch die funktionale Integrität der Endothelzellen gestört wird [39, 126]. Diese ROS schädigen, wenn sie in hinreichender Konzentration gebildet werden, nicht nur zelluläre Membranen, sondern verändern auch die Struktur und Funktion von Makromolekülen. So werden zum Beispiel die beiden Transkriptionsfaktoren NF-κB und AP-1 durch ROS reguliert. Die Aktivierung dieser Faktoren verändert die Expression der Gene für Adhäsionsmoleküle und Cytokine. Letztendlich mündet dies in einer verminderten Vasoreaktivität (verminderter Relaxation, Abnahme der Stickstoffmonoxidsynthese), einer erhöhten Permeabilität für Plasmaproteine (insbesondere Lipoproteine) und einer Hyperadhäsivität für Leuko- und Thrombozyten. Besondere Bedeutung kommt hier den Stimuli zu, die man besser unter dem Namen „kardiovaskuläre Risikofaktoren“ kennt: Homocysteinämie, Dyslipidämie, Nikotinabusus, arterielle Hypertonie, postprandiale Hyperglykämie, Insulinresistenz, Diabetes mellitus. All diese wirken auf direktem oder indirektem Wege auf das empfindliche Gleichgewicht der Endothelmembran, so dass dieses zu Gunsten des oxidativen Stresses verschoben wird.

Nach dem heutigen Kenntnisstand kommt es zunächst zu einer Einlagerung von cholesterinhaltigen Lipoproteinen (LDL) in umschriebenen Bezirken der Gefäßwand, die nachfolgend einem Oxidationsprozeß unterliegen. Diese werden vom Endothel als drohende Gefahr erkannt, so dass vom Endothel vermehrt Rezeptoren an der Oberfläche exprimiert und verschiedenste Mediatoren sezerniert werden. Davon angelockte Monozyten wandern in die Intima ein und wandeln sich in Makrophagen, phagozytieren die eingeschwemmten Lipide und entwickeln sich dadurch selbst zu so genannten Schaumzellen (engl. „foam cells“). Mit der Ausschüttung von Mediatoren aus dem Endothel, der Anlockung von Entzündungszellen und der Umwandlung der Makrophagen in Schaumzellen, beginnt eine Kaskade von Reaktionen, die in einem Circulus vitiosus mündet. So werden von allen

beteiligten Zellen in unterschiedlichem Ausmaß Cytokine aktiviert. Die Cytokine induzieren ihrerseits prokoagulatorische Gewebsfaktoren und führen über eine Expressionsinduktion von Adhäsionsmolekülen, wie ICAM-1, ICAM-2 (engl. „intercellular adhesion molecule“), VCAM-1 („vascular cell adhesion molecule“), ELAM (engl. „endothelial leucocyte adhesion molecule“) zu deren Vermehrung auf den Endothelzellen. Thrombozyten lagern sich an, und die neuen Leukozyten (vor allem Monozyten und T-Zellen) migrieren in den endothelialen Raum [45]. Dort werden sie wiederum durch unterschiedliche Faktoren (unter anderem oxidiertes LDL [40, 41]) aktiviert und sezernieren nun ihrerseits Mediatoren, die den Prozess der Läsionsentstehung weiter fördern und akzelerieren. Glatten Muskelzellen wandern aus der Media in die Intima und proliferieren, so dass sich eine Deckschicht über die histologisch sichtbare mehrschichtige Anordnung von Leukozyten legt. Diese Anordnung bezeichnet man als „frühe Läsionen“ (engl. „early lesions“). Diese gehen mit der Zeit in eine fibröse Plaque samt einer bindegewebigen Kappe über, die nun das Gefäßlumen immer mehr einengt und zu regionaler Minderperfusion mit Ischämie im nachfolgenden Versorgungsgebiet führen kann. Die Monozyten können aber auch zur Abgabe von Enzymen veranlaßt werden, die Kollagen abbauen. Dann wird die fibröse Kappe angedaut und reißt plötzlich ein, das heißt, es kommt zu einer Plaqueruptur, welche über die Aktivierung der Gerinnungskaskade — vermittelt durch den Tissue Factor (TF) — zur akuten Verlegung des Gefäßlumens durch Thrombenbildung führt. Bereits im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der von Leukozyten produzierten Cytokine atherosklerotische Gefäßveränderungen reduziert [65, 64, 67, 69].

1.2 Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus ist in der gesamten westlichen Welt eine Volkskrankheit mit zunehmender medizinischer und sozioökonomischer Bedeutung. Derzeit sind in Deutschland circa fünf Millionen Menschen mit Diabetes mellitus bekannt. Man muß von weiteren zwei bis drei Millionen nicht bekannter Fälle ausgehen. Die durch den Diabetes mellitus verursachten Kosten betragen nach Schätzungen der CODE-2-Studie (Cost of Diabetes in Europe for Type 2 Diabetes) circa 1,8 Mrd. Euro pro Jahr in Deutschland. Verantwortlich für die Kosten ist in erster Linie nicht die metabolische Stoffwechsellage des Diabetes mellitus, sondern die diabetischen Spätkomplikationen, beziehungsweise die sogenannten kardiovaskulären Folgeerkrankungen.

Ursächlich für die Erkrankung an Diabetes mellitus ist eine endokrine Störung der Glukoseverwertung aufgrund eines absoluten (Typ 1-Diabetiker) oder relativen (Typ 2-Diabetiker) Insulinmangels. Speziell beim Typ 2-Diabetiker ist die gestörte Glukosetoleranz entscheidend: Auf der molekularen Ebene bedeutet dies, dass aufgrund der zunehmenden Insulinresistenz unter anderem die Bereitstellung an so genannten Glukose-Transportproteinen sinkt, welche dafür verantwortlich sind, Glukose in die Zelle einzuschleusen. Außerdem steigt die Expression von Cytokinen wie dem Tumor necrosis faktor-α (TNF-α) und dem Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1), welche die Insulinresistenz weiter verstärken [49, 57]. Des Weiteren kommt es in Folge der Insulinresistenz zu einer vermehrten Lipolyse, das heißt die freien Fettsäuren im Plasma steigen an. Sie hemmen die Glukoseaufnahme und -utilisation in der Skelettmuskulatur, führen zu einer gesteigerten Glukoneogenese in der Leber — welche die Blutzuckerspiegel noch weiter in die Höhe treibt — und schließlich steigen triglyceridhaltiger Lipoproteine, wie zum Beispiel LDL, mit Alteration des Gerinnungssystems [14, 103]. Spätestens hier münden die moleku-

laren Mechanismen in den Prozess der Arteriosklerose entstehung, indem sie über die Vermehrung der LDL-Konzentration oxidativen Stress erzeugen und die endotheliale Dysfunktion vorantreiben. Für die in dieser Arbeit betrachteten Reaktionen der Thiazolidindione auf Endothelzellen ist jedoch ein bisher nicht genannter, hierbei auftretender molekularer Mechanismus, von besonderem Interesse: Physiologisch entstehen im Blut immer wieder nichtenzymatisch-glykierte Endprodukte, so genannte „advanced glycation endproducts (AGEs)“, die an der Arteriosklerose maßgeblich beteiligt sind (genauer Mechanismus siehe unten [118]). Beim Diabetiker sind die Blutzuckerspiegel dauerhaft erhöht und folglich steigen im Gegensatz zum Nicht-Diabetiker die Glykierungsvorgänge quantitativ an. Es entstehen vermehrt AGEs, welche über spezifische Rezeptoren auf vaskuläre Zellen der Gefäßwand atherogen wirken. Sie werden für die Entstehung arteriosklerotischer Gefäßveränderungen als entscheidender Stimulus verantwortlich gemacht.

Die Gesamtheit aller beim Diabetiker auftretenden molekularen Mechanismen erhöht das Arteriosklerose risiko des Diabetikers um ein Vielfaches. Dies spiegelt sich beim Diabetiker in den schon früh auftretenden generalisierten Mikro- und Makroangiopathien wieder. Die Morbidität und Mortalität der Diabetiker ist heute nicht mehr durch die akute metabolische Stoffwechseldekompensation, sondern durch einen dramatischen Anstieg der diabetischen Folgeerkrankungen, das heißt vaskulären Komplikationen der Erkrankung, bestimmt. So versterben nur 1% im Koma, 70–80% Prozent aber an den Folgen von Retinophatie, Nephropathie, diabetischer Fuß, Schlaganfall und Myokardinfarkt.

1.3 Das AGE-RAGE-Konzept

Ein Konzept zur Aufklärung des komplexen Mechanismus der Mikro- und Makroangiopathien beim Diabetiker beschäftigt sich mit den so genannten nichtenzymatisch glykierten Endprodukten (advanced glycation endproducts, AGEs) und ihren Wirkungen auf die Gefäßwand [7, 16, 19, 114, 117, 139, 144].

AGEs entstehen, wenn reduzierte Zucker in der offenen Aldehydform mit freien N-terminalen und/oder ε-ständigen Aminogruppen von Makromolekülen (Lipide, Proteine, Nukleinsäuren etc.) durch kovalente Bindungen — das heißt nichtenzymatisch — mit einander reagieren [97]. Die hieraus entstandenen Folgeprodukte sind Schiff'sche-Basen, welche sich in kurzer Zeit zu stabilen, jedoch noch reversiblen Zwischenprodukten, den so genannten Amadori-Produkten umformen. Die offene Kettenform des dabei gebildeten Ketoamins kann mit anderen Aminogruppen reagieren. Durch Oxidation, Dehydrierung, Kondensation und Elimination entstehen irreversible, quervernetzte Komplexe. Diese in ihren physiochemischen Eigenschaften veränderte heterogene Gruppe von Derivaten, welche typischerweise proteaseresistent, fluoreszierend, von brauner Farbe und nur noch schlecht abbaubar sind [34], wird als AGEs bezeichnet. Die AGE-Bildung tritt physiologisch beim Altern und verstärkt beim Diabetes mellitus auf. Sie findet sich aber beispielsweise auch in den senilen Plaques bei Morbus Alzheimer, der β-3-Mikroglobulin-haltigen Amyloidose des Urämikers und bei Rauchern [87, 88, 145, 147]. Der bekannteste Vertreter der AGEs ist glykiertes Hämoglobin, bekannt als HbA1c [94, 11].

Normalerweise werden AGEs durch ein spezifisches Rezeptorsystem von Makrophagen gebunden und so wieder degradiert [138]. Die entstandenen löslichen AGE-Peptide werden über die Niere ausgeschieden [70]. AGEs binden darüber hinaus jedoch auch an andere Proteine: Der bekannteste Rezeptor an den sie sich binden, ist

der so genannte RAGE-Rezeptor (Receptor for advanced glycation endproducts). RAGE-Rezeptoren sind Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie [95, 116]. Es handelt sich um 35 kD-Proteine. RAGEs werden regulär von Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Monozyten, beziehungsweise Makrophagen, T-Lymphozyten, Thrombozyten, Fibroblasten, Mesangialzellen und Neuronen exprimiert [15, 114]. Sie können mit verschiedensten Liganden (eingeschlossen AGEs) interagieren [114, 48, 117, 145].

Die Bindung von AGE an RAGE bewirkt intrazellulären oxidativen Stress und spezifische intrazelluläre Signalmechanismen. Es kommt zu einer lang anhaltenden Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB, welcher selbst die Expressionsinduktion proinflammatorischer und prokoagulatorischer Gene initiiert [115, 62, 114, 10, 146]. Des Weiteren können nicht nur AGEs, sondern auch Moleküle, die von polymorphkernigen Leukozyten freigesetzt werden und im Rahmen chronisch-entzündlicher Prozesse akkumulieren (Peptide der S100/calgranulin Familie), RAGE aktivieren [47]. Die basale RAGE-Expression auf Endothelzellen kann durch AGEs, Lipopolysaccharide (LPS), tumor necrosis factor α (TNF-α) oder auch β-Östradiol erhöht werden [15, 133, 68]. Dieser Mechanismus wird für AGEs und TNF-α ebenfalls über die Aktivierung von NF-κB, beziehungsweise für β-Östradiol über SP-1 [133, 68] reguliert. Ebenso können Cytokine wie auch die Bindung eines Liganden an RAGE diesen induzieren [94]. Eine Induktion der endothelialen RAGE-Expression lässt sich auch histologisch an Gefäßen von Diabetikern, Urämikern und Patienten mit Vaskulitis nachweisen [110, 117, 12, 1, 13]. Interessanterweise findet man beim Diabetiker in mononukleären Zellen dauerhaft aktiviertes NF-κB. Dieses Phänomen, so glaubt man, beruht auf permanenter RAGE-Stimulation [94].

Eine Hemmung der RAGE-Synthese durch Transfection von RAGE-antisense Oligonukleotiden oder die Blockierung der AGE-Rezeptoren durch neutralisieren-

de Antikörper heben die AGE-vermittelten Effekte in vaskulären Zellen auf [147, 10]. Tierexperimentelle Studien an Mäusen konnten zeigen, dass dort eine Hemmung der AGE/RAGE-Interaktion zu einer signifikanten Abnahme der Atherosklerose führt [43, 101, 141, 104]. Auf Basis dieser Daten könnte eine Reduktion der RAGE-Expression in vaskulären Zellen speziell für Diabetiker ein viel versprechender Ansatz zur Beeinflussung der Atherogenese sein [118].

1.4 Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs)

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) sind nach der ursprünglichen Eigenschaft, die über sie bekannt wurde, benannt: Man fand, dass sie in der Leber von Nagetieren Peroxisomen vergrößern und vermehren. Beim Menschen konnte man dieses Phänomen nie nachweisen und sie wurden hier initial als Regulatoren im Lipidstoffwechsel und der Adipogenese charakterisiert. Heute sind sie als nukleäre Transkriptionsfaktoren bekannt und scheinen viele andere Stoffwechselwege zu beeinflussen. Arbeiten der letzten Jahre zeigen, dass vor allem PPAR-γ antiinflammatorische Wirkung in vaskulären Zellen hat [26, 27, 79, 81, 130].

Die PPARs sind Mitglieder der nukleären Rezeptorfamilie. Sie sind Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren mit einer Liganden- und einer DNA-Bindungsdomäne, die spezifische Zielgene regulieren [121, 122]. Bisher sind drei PPAR-Unterformen bekannt: PPARα, PPARγ und PPARδ (früher PPARβ, synonym verwendet: NUC-1 oder FAAR). Sie weisen untereinander eine circa 60–80%ige Homologie in ihren Bindungsdomänen auf. Sie werden jedoch von verschiedenen Liganden aktiviert und regulieren auch unterschiedliche Gene [122]. Bindet einer der spezifischen Liganden an einer Ligandendomäne des PPAR, wird dieser aktiviert, wandert in den Zellkern und verbindet sich dort mit einem weiteren nukleären

Transkriptionsfaktor, dem Retinoic X Rezeptor (RXR), zu einem Heterodimer. In dieser Form sind die Rezeptoren in der Lage, an die für sie spezifischen Promoterregionen ihrer Zielgene zu binden (siehe Abbildung 1; [121, 122]). Man bezeichnet diese Bindungsstellen als „PPAR-response elements (PPREs)“. Sie bestehen aus zwei sich wiederholenden Hexanukleotidsequenzen, die durch ein einzelnes Nukleotid getrennt sind, so genannte Direct-repeat-1-Sequenzen (DR-1; [31, 120]). Darüber hinaus können PPARs (vor allem PPARα) die Aktivierung anderer Transkriptionsfaktoren, wie AP-1 und NF-κB hemmen [79, 130].

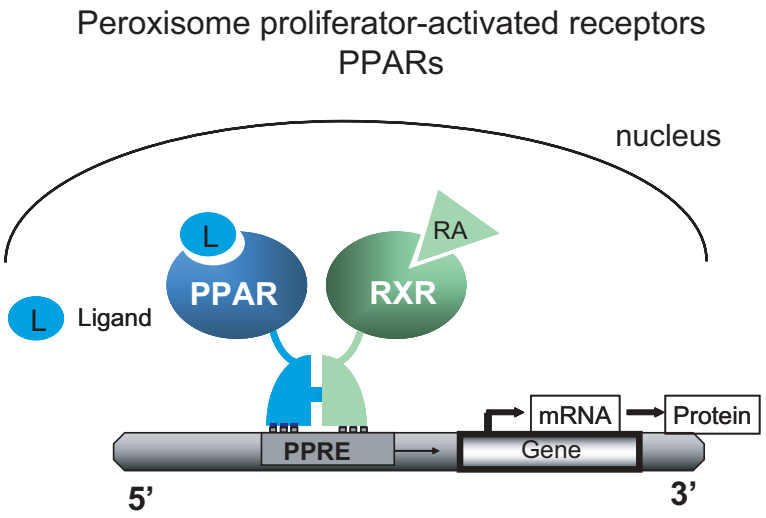


Abbildung 1. Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der Wirkung von PPARs (Peroxisome proliferator-activated receptors). Nach der Aktivierung durch Liganden bilden PPARs Heterodimere mit dem Retinoic X Rezeptor RXR, binden an spezielle PPAR response elements PPREs in der Promotorregion ihrer Zielgene und regulieren so die Genexpression [73].

Für diese Arbeit entscheidend sind die Mechanismen des PPARγ, so dass auf eine Charakterisierung von PPARα und PPARδ verzichtet wird.

Die Exspression von PPARγ findet sich in Endothelzellen und Monozyten beziehungsweise Makrophagen von Leber, Dünndarm und Niere. Einige Arbeitsgruppen konnten PPARγ auch in glatten Muskelzellen detektieren [55, 74, 82, 109], jedoch gibt es hier auch gegenteilige Aussagen. PPARγ ist von seiner Wirkung her ein zentraler Mediator der Genregulation in der Adipogenese [136]. Es konnte weiter gezeigt werden, daß über die PPARγ-Aktivierung die „fetty streaks“ reduziert werden und die Migration von glatten Muskelzellen gehemmt wird [50, 150]. PPARγ-Liganden haben sogar teilweise einen positiven Einfluß auf aktivierte Blutplättchen [107, 108]. Typisch natürliche Liganden von PPARγ sind die 15-deoxy-$^{\Delta 12,14}$-Prostaglandin J_2 (15d-PGJ_2), Prostaglandin D_2-Derivat und bestimmte Formen oxidierter Linolensäure (9[S]-, und 13[S]HODE; [59, 90, 137]). Von den synthetischen Aktivatoren ist vor allem die Gruppe der Thiazolidindione nennenswert. Diese Gruppe gehört zu den oralen Antidiabetika, ihre Vertreter sind Troglitazon (nicht mehr auf dem Markt), Pioglitazon oder Rosiglitazon (BRL49653; [66]). Desweiteren zeigte sich kürzlich, daß auch Telmisartan, aus der Gruppe der Antihypertensiva, ein partieller PPARγ-Agonist ist [123].

1.5 Thiazolidindione

Die oralen Antidiabetikagruppe der Thiazolidindione (Synonym: Glitazone) sind in der Lage, diese sowohl in Leber, Fettgewebe als auch Muskel zu reduzieren und darüber die Blutglukosespiegel senkt [6, 143]. Das Grundgerüst aller Glitazone bildet die Thiazolidin-2-4-dion-Struktur. Die bisher bekannten Vertreter dieser Gruppe unterscheiden sich durch unterschiedliche Seitenketten voneinander. Aus dem ursprünglichen Ciglitazon entstand plus Vitamin E Troglitazon. Die zwei derzeit im Handel befindlichen Glitazone Rosiglitazon (Avandia®) und Pioglitazon (Actos®) unterscheiden sich nur minimal. Der molekulare Wirkungsmechanismus der Glita-

zone beruht auf ihrer Eigenschaft als PPARγ-Aktivatoren. (Details siehe Abschnitt über PPARγ; [148, 9, 66]). Rosiglitazon hat darüber hinaus offenbar auch noch eine nicht PPARγ-vermittelte Wirkung [147, 17]. Durch die PPARγ-Aktivierung werden vermehrt Proteine synthetisiert, die positive Effekte auf die metabolische Stoffwechsellage haben, indem sie grundlegend in den Glukose- und Lipidstoffwechsel eingreifen [4]. Klinisch bedeutet dies, dass sie durch die Verbesserung der Insulinwirkung einerseits den Insulinspiegel [149, 56] und die Glukoneogenese senken [36], andererseits Glukosetransportermoleküle [129] und die Glukoseclearance erhöhen. Die Effekte sind am Blutglukosespiegel und dessen Langzeitwirkung (über den HbA1c) messbar [87]. Es gibt bereits Hinweise, dass sie auch eine Stabilisierung der Betazellfunktion des Pankreas herbeiführen [37, 102, 85, 38]. Die beim Diabetiker bestehende Dyslipidämie wird ebenfalls positiv beeinflusst. Glitazone induzieren die Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten [32], steigern damit die Aufnahme von freien Fettsäuren in die Zellen, beziehungsweise bewirken, dass der Triglyceridspiegel zugunsten eines steigenden HDL-Spiegels sinkt [98, 134, 3, 99, 17].

Abgesehen von den metabolischen Effekten, die die Gruppe der Thiazolidindione als Antidiabetika klassifizieren, mehren sich derzeit die Hinweise, dass die Glitazone darüber hinaus auch noch lokale antiinflammatorische und antiatherogene Effekte an Gefäßwand, Herz und Nieren ausüben [25, 42, 35, 127]. So zeigte sich bereits, das Glitazone die Exspression von Chemokinen hemmen, welche für die Rekrutierung von Entzündungszellen (Monozyten und T-Zellen) mit Freisetzung von proinflammatorischer Cytokinen [111] in atherosklerotischen Läsionen verantwortlich sind und Cytokine modulieren [77]. Sie reduzieren in Makrophagen die Freisetzung matrixdegradierender Enzyme, was zur Plaquestabiliserung beiträgt [82] und hemmen Migration glatter Gefäßmuskelzellen in vitro [80, 41]. Makroskopisch zeigten sie in Tiermodellen, dass sie die Atherosklerose signifikant senken können,

gemessen an der Plaquegröße im Aortenbogen und der Intimahyperplasie nach Gefäßverletzung [67, 65]. Ob dies auch für Menschen gilt, kann man unter anderem durch atherosklerotische Surrogatparametern zeigen. Surrogatparameter sind beispielsweise PAI-1, die physiologisch die Fibrinolyse im Blut hemmt [22, 60]. Glitazone erreichen hier eine signifikante Reduktion [30, 33]. Oder E-Selektin, ein Adhäsionsmolekül, welches die Einwanderung von Leukozyten in die Gefaeßwand vermittelt, Troglitazon und Rosiglitazon können dieses signifikant senken [21]. Eine funktionelle Verbesserung der Gefäßfunktion durch Reduktion der endothelialen Dysfunktion wurde unter anderem von Murakami und seinen Kollegen eruiert [89]. Glitazone hemmen das Zellwachstum und die Zellmigration in der glatten Gefäßmuskulatur, wobei es zu potenziell günstiger Wirkung auf Restenosierung und Atherosklerose kommt [64]. An der Niere zeigen sich die positiven Wirkungen der Glitazone in einer Verzögerung der Proteinurie und des renalen Tubulusschadens bei der diabetischen Nephropathie sowie in einer verbesserten Albuminausscheidung im Urin (Mikroalbumin ist ein Marker für die endotheliale Dysfunktion; [2, 142]). Sie scheinen demzufolge auf allen Phasen der Atherogenese protektive Effekte zu haben und in der Lage zu sein, den Circulus vitiosus an proinflammatorischen Prozessen bei der Atherosklerosentstehung zu durchbrechen [72, 55].

Die Substanzen sind als Mono- oder Kombinationstherapie mit anderen oralen Antidiabetika zugelassen. Sie werden gut resorbiert, ihre orale Bioverfügbarkeit beträgt 99%. Nach circa 3,5 Stunden sind maximale Plasmaspiegel erreicht bei einer altersunabhängigen Halbwertszeit von 3–4 Stunden [28]. Sie werden vollständig metabolisiert (Pioglitazon vorwiegend über das Cytochrom-P450, Rosiglitazon vorwiegend über CYP_2C8 und CYP_2C9 [135]). Die Ausscheidung erfolgt über den Urin. Eine Dosisreduktion ist nur bei Leberinsuffizienz erforderlich. Insgesamt haben die Glitazone eine gute Verträglichkeit, so entsprach die Häufigkeit der Nebenwirkungen unter einer Rosiglitazontherapie der Häufigkeit in der Placebogruppe.

Nebenwirkungen treten altersunabhängig auf [8]. Die unter Troglitazon bekannt gewordenen circa 65 Einzelfälle an Lebertoxizität scheinen von der α-Tocopherol-Seitenkette hervorgerufen zu werden, da bei deren Metabolisierung freie Sauerstoffradikale entstehen können. Es handelt sich nicht um einen Klasseneffekt [140]. Allerdings können im Rahmen der vermehrten Natriumrückresorption, Vasodilatation und antagonisierendem Kalziumeffekt, welche durch die verbesserte Insulinwirkung hervorgerufen werden, dosisabhängige periphere Ödeme auftreten [128]. Interessanterweise scheinen sie weder zu einer kardialen Dekompensation zu führen, noch überhaupt damit zu korrelieren. Es gibt sogar Hinweise auf eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion unter Glitazonen. Es kann unter der Therapie zu einer Gewichtszunahme von circa zwei bis drei Kilogramm des subkutanen Fettgewebes bei gleichzeitiger Verbesserung der Fettdepots in der Leber und des visceralen Fettes kommen [86, 18, 5]. Eine Hypoglykämie, wie sie bei anderen oralen Antidiabetika befürchtet wird, tritt mit einer Hypoglykämierate von circa nur 1% versus 16% bei Glibenclamid auf [100]. Als Kontraindikationen gelten: Diabetes mellitus Typ 1, diabetische Ketoacidose, Schwangerschaft und Stillzeit, ausgeprägte Anämie, Herzinsuffizienz (NYHA $\geq$ III, Leberfunktionsstörungen mit ALT-Erhöhung $\geq$ 2,5-faches der Norm).

Anhand dieser Daten stellt sich die Frage, ob diese Substanzen neben der blutzuckersenkenden Wirkung über eine Aktivierung des Peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARγ) möglicherweise eine Hemmung der RAGE-Expression, das heißt eine Down-Regulation des Rezeptors auf vaskulären Zellen, bewirken könnten und direkt atheroprotektive Effekte haben. Über die Wirkung von PPARγ auf die endotheliale RAGE-Expression ist jedoch bislang nichts bekannt. Dies könnte aber ein interessanter neuer therapeutischer Ansatz zur Modulation der Atherogenese beim Diabetiker darstellen. Und diesen Substanzen könnte

aufgrund ihres kausalen Therapieansatzes ein hohes therapeutisches Potential zugeschrieben werden. Bislang gibt es hierzu noch keine Untersuchungen.

1.6 Fragestellung

Die vorliegende Arbeit geht der Hypothese nach, dass die endotheliale RAGE-Expression in humanen Endothelzellen durch PPARγ-aktivierende Glitazone signifikant reduziert werden kann.

Geprüft werden solle dies invitro mittels verschiedener spezieller PPARγ-Aktivatoren aus der Gruppe der Thiazolidindione. Wenn PPAR-Aktivatoren die RAGE-Expression reduzieren, soll weiter geprüft werden, ob eine charakteristische Dosiswirkungsbeziehung vorliegt.

Die Hypothese, dass PPARγ-Aktivatoren die basale und induzierbare RAGE-Protein-Expression hemmen, soll hier mittels FACS (Fluorescence-activated cell sorter)-Analysen untersucht und der Mechanismus gegebenenfalls mit Western Blot-Analysen bestätigt werden. Die Dosiswirkungskurve wird ebenfalls mittels Western Blot-Analysen erstellt.

2 Material und Methoden

Im ersten Abschnitt des folgenden Kapitels sind alle Chemikalien, beziehungsweise Materialien nach ihrem Verwendungszweck gruppiert und dabei jeweils alphabetisch aufgelistet. Alle hier nicht eigens mit Firmennamen versehenen, im Nachfolgenden jedoch erwähnten Chemikalien, wurden von der Firma Sigma (St. Louis, USA) bezogen.

2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

In diesem Kapitel sind alle notwendigen Materialien nach abgeschlossenen Arbeitsschritten und in der Reihenfolge ihrer Durchführung sortiert.

2.1.1 Zellkultur und Zellisolierung

- Antibiose: Penicillin/Streptomycin (PS; Cat.-No. A 2212); Fa. Biochrom AG.
- DMEM: Dulbeccos Modified Eagle Medium; Fa. Life Technologies, Schottland.
- DMSO: Dimethylsulphoxide; Fa. Sigma, St. Louis, USA.

- EBM: Endothelial Cell Basal Medium (C-22210), ECGS/Heparin (C-30120); Fa. Promo Cell.
- Eppendorfgefäße: Safe-Lock Tubes 1,5 ml Eppendorf Biopur (0030 121.589), Standartpipettenspitzen; Fa. Eppendorf-Netheler-Hing GmbH.
- Essigsäure; Fa. Riedel-de Haen.
- Falcons: 15 ml und 50 ml Tube (352070, 352095); Zellkulturplatten: multiwell; Zellschaber: Cell Scraper (353086); Fa. Becton Dickinson, Lincoln Park, USA.
- FCS: fetales Kälberserum; Fa. PAA, Deutschland.
- Kollagen I (C-9791); Fa. Sigma, St. Louis, USA.
- Kollagenase D; Fa. Boehringer, Mannheim.
- L-Glutamin (Cat.-No. 25030-024), PBS: Dulbeccos 500 ml (Cat.-No. 14190-094); Fa. Gibco BRL.
- PBS; Fa. Biochrom AG (L 2143).
- PBST: PBS mit TWEEN 20.
- Petrischalen und Flaschen; Fa. Greiner GmbH, Frieckhausen.
- TWEEN 20 (# P-1379); Fa. Sigma, St. Louis, USA.
- Zellen/HSVECs: Für die vorliegenden Untersuchungen wurden humane Endothelzellen eigens aus Abschnitten der Vv. saphenae magnae, aus der Thorax- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikum Ulms, isoliert und zum anderen bereits isolierte gepoolte humane Endothelzellen, ebenfalls aus den Vv. saphenae magnae (HSVECs) der Fa. Biochrom (# 1210121), verwendet.

2.1.2 Zellstimulation

- Pioglitazon: Pioglitazone-HCL; Fa. Chemical Industries, LTD Takeda (Lot HB068).
- Rosiglitazon: BRL (49653-C BN8), Rosiglitazone powder; Fa. SmithKline Beecham, West Sussex.
- TNF-α: Tumornekrose-Faktor-α (Lot 51 K1756); Fa. Sigma, St. Louis, USA.

2.1.3 FACS/Durchflußzytometrie

- Antikörper:
  - First AK: anti-RAGE (chicken, 1:100 eingesetzt); Labor Wautier, Paris.
  - Secondary AK: anti-chicken (IgG unspezifisch, 1:100 eingesetzt, FITC-konjugiert); Fa. Dianova, Hamburg.
- FACS-Falcon: 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube; Fa. Becton Dickinson, Labware Europe (USA).
- Formalin: 1%ig; Fa. Merck, Darmstadt.

2.1.4 Western-Blots

- α-Tubulin (T-5608); Fa. Sigma, St. Louis, USA.
- Antikörper:
  - First AK: anti-RAGE (goat, polyclonal antibody, IgG, 1:100 eingesetzt, SC-8230); Fa. Santa Cruz, USA.

  - Secondary AK: anti-goat (sheep, monoclonal antibody, IgG, HRP (Peroxidase)-konjugiert, 1:10 000 eingesetzt, Cat.-No. A9452); Fa. Sigma, St. Louis, USA.
  - First AK: anti-α-Tubulin (mouse, monoclonal antibody, IgG, 1:2 000 eingesetzt, Cat.-No. T5168; Fa. Sigma, St. Louis, USA.
  - Secondary AK: anti-mouse (rabit, IgG, Peroxidase-konjugiert, 1:10 000 eingesetzt, Cat.-No. P 0260); Fa. Dako A/S, Dänemark.

- Bench Marker; Fa. Gibco BRL.
- 30% Bis-Acrylamide: Fa. Bio-Rad, USA.
- BSA (bovines Serumalbumin), β-Mercaptoethanol, Bromphenolblau (BPB), Glycin, Glycerol, PMSF; Fa. Sigma, St. Louis, USA.
- Chemolumineszenz-Reagenz: Super Signal®/West Pico Chemoluminescense Substrate (Nr. 34080); Fa. Pierce.
- Nylonmembran Western-blot: Hybond, Röntgenfilme: Hyperfilm; Fa. Amersham pharmacia, Uk.
- NUNC 96 well Mikrotitrierplatte.
- SDS; Fa. Roth, Deutschland.
- TRIS: 2-Amino-Hydroxy-Methyl-1,3-Propandiol; Fa. Serva, Heidelberg.
- Trockenmilch; Fa. Flika.
- Whatman: Gel-Blotting-Paper GB 004; Fa. Schleicher und Schuell.

2.2 Lösungen

In diesem Kapitel sind ebenfalls alle notwendigen Materialien nach abgeschlossenen Arbeitsschritten und in der Reihenfolge ihrer Durchführung sortiert.

2.2.1 Zellkultur und Zellisolierung

- DMEM-Lösung: DMEM mit 10% FCS,1% PS und 1% L-Glutamin.
- Endothelzell-Basalmedium: 1% Penicillin/Streptomycin/L-Glutamin, 10% FCS unaktiviert (1 Stunde; 56°C) steril filtriert, 0,4% ECGS/Heparin.
- 100 × (Kollagen-)Stocklösung: 50 mg Kollagen I in 16,6 ml 0,5 M Essigsäure (steril) gelöst; 1 × Kollagen: 1:100 in PBS und 0,5% 1 N NaOH.
- PBS-Dulbeccos; Fa. Gibco BRL.
- Trypsin/EDTA-Lösung: Trypsin 0,05%, EDTA 0,02%, in PBS gelöst, steril filtriert.

2.2.2 Western-Blots

- Loading-Buffer: (5 ×) 5 ml 0,5 M TRIS pH 6,8, 4 ml Glycerol, 0,8 g SDS, 0,5 ml β-Mercaptoethanol (immer frisch zugeben), 125 mg BPB, aqua ad; bei RT lagern, für Gebrauch auf 56°C bringen.
- Lysepuffer: 2 ml 1 × NP 40 Stock, 100 μl 100 mM PMSF, je 1 μl Aprotinin/Leupeptin/Pepstatin, aqua ad 10 ml.
- 5 × NP 40 Stock: 5% NP 40, 250 mM TRIS pH 8,0, 750 mM NaCl, aqua ad.

- Running-Buffer: (10 ×) 30,3 g Trizma Base, 141 g Glycin, 10 g SDS, aqua ad 1 l, auf pH 8,3 einstellen.
- Sample-Gel: 10% Acrylamide, 0,375 M TRIS pH 8,8, 0,1% SDS, aqua ad; frisch zugeben: 0,1% APS und 0,02% Temed.
- Stack-Gel: 5% Acrylamide, 0,125 M TRIS pH 6,8, 0,1% SDS, aqua ad; frisch zugeben: 0,1% APS und 0,02% Temed.
- Stripping-Lösung: 2% SDS, 62,5 mM TRIS pH 6,7, 100 mM β-Mercaptoethanol, aqua ad.
- Transfer-Buffer: (10 ×) 30,0 g Trizma Base, 112,6 g Glycin, aqua ad 1 l, auf pH 8,3 einstellen; to use: 10% 10 × Stock Transfer-Buffer, 10% Methanol, 80% aqua.

2.3 Geräte

- Blotgerät Western-Blot: Trans-blot Semi-Dry, Biometra Power Pack 25; Fa. Biometra.
- Brutschrank, Zentrifuge: Biofuge fresco (Varifuge 3. OR); Fa. Heraeus, Deutschland.
- Elektronische Feinwaage; Fa. Ika-Werke.
- ELISA-Reader, Röntgenkassetten; Fa. Rego, Deutschland.
- FACS Calibur Durchflußzytometer, Densitometer; Fa. Becton Dickinson, USA.
- Lamina Air Flow; Fa. Heraeus, Deutschland.

- Pipetten: Multipipette, Pipetman; Fa. P Gilson. Pipetus-akku; Fa. Hirschmannlaborgeräte.
- Thermoblock; Fa. Eppendorf.
- Vortexer; Sientific Industries (SI).
- Western(vertical)-Elektrophoresekammer; Fa. Biometra.
- Densitometer; Fa. Eppendorf.

2.4 Methoden

Dieses Kapitel gliedert sich nach den einzelnen durchgeführten Methoden, beginnend mit der für alle Methoden notwendigen Anzucht und Erhaltung der Zellkulturen.

2.4.1 Isolierung und Kultivierung von humanen Endothelzellen

Zur Isolierung der Endothelzellen aus den Abschnitten der Vena saphena magna wurden die Venen vorsichtig mit DMEM-Lösung vorgespült. Anschließend wurden die Venen mit Kollagenaselösung (1 mg/ml in PBS) gefüllt und beidseitig für 30 Minuten abgeklemmt. Um sie in dieser Zeit vor Austrocknung zu schützen, wurden sie in Zellkulturschalen mit 25 ml DMEM-Lösung gelegt. Dieser Schritt wurde insgesamt zweimal durchgeführt. Nach der Inkubationszeit wurden die Venen über einem 15 ml-Reaktionsgefäß mit 10 ml DMEM-Lösung geöffnet und fünfmal mit Kollagenase gespült. Die Reaktionsgefäße wurden dann für fünf Minuten bei 1 000 rpm zentrifugiert. Nun wurde der Überstand verworfen und die isolierten

Zellen in 3 ml Endothelzellmedium resuspendiert und waren damit fertig zur Aussaat.

Die so isolierten oder auch bestellten humanen Endothelzellen wurden in mit Kollagen beschichteten Zellkulturflaschen angezüchtet und für die einzelnen Versuchsreihen in ebenfalls mit Kollagen beschichteten Petrischalen ausgesät. Dazu mussten die Flaschen und Petrischalen zunächst wie folgt gecoatet werden: Zur Beschichtung der Flaschen und Petrischalen mit Kollagen I wurden 100 × (Kollagen-)Stocklösung mit 1 × PBS 4°C 1:100 verdünnt angesetzt. Dazu wurden 50 μl/10 ml 1 N NaOH 4°C (zum Neutralisieren) zugegeben. Von dieser Lösung wurden in jede Flasche 5 ml und in jede Petrischale 3 ml pipettiert. Die Flaschen und Schalen wurden für 30 Minuten in den Brutschrank gegeben, anschließend der Überstand abgesaugt. Damit waren die Flaschen/Petrischalen gebrauchsfertig und die Zellen konnten in 10 ml (Flasche) beziehungsweise 5 ml (Petrischale) Endothelzellbasalmedium eingebracht werden.

Die Zellen wurden in einer Atmosphäre von 37°C, 5% CO_2 und H_20 gesättigt im Brutschrank kultiviert. Alle drei Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Die Zellen wurden von der zweiten bis zur fünften Passage verwendet.

Zum Splitten wurde das alte Medium aus den Flaschen abgesaugt und die Flaschen wurden mit 5 ml PBS (37°C) gespült. Dann wurden die Flaschen für ein bis zwei Minuten mit 2,5 ml Trypsin/EDTA (37°C) inkubiert (mikroskopisch wurde das Ablösen der Zellen kontrolliert). Dann wurden die Flaschen mit 5 ml Medium erneut gespült und der Inhalt in Falcons überführt. Diese wurden für fünf Minuten bei 12 000 rpm (RT) in die Zentrifuge gegeben. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellpellets mit etwas Medium wieder resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit der Pipette je nach Dichte auf eine entsprechende Anzahl neuer kollagenbeschichteter Flaschen verteilt und mit Medium versorgt.

2.4.2 Zellstimulation

Die Stimulation der kultivierten Endothelzellen erfolgte bei einer Konfluenz von 90–100%. Die einzelnen Petrischalen wurden dazu je nach Versuchsreihe entweder „basal“, dass heißt direkt durch Zugabe der PPARγ- Aktivatoren, in entsprechender Konzentration oder gleichzeitig mit 25 ng/ml beziehungsweise 50 ng/ml TNF-α stimuliert (siehe auch Kapitel 3). Anschließend wurden die Petrischalen bei der FACS-Färbung und dem Western-Blot für weitere 16 Stunden in den Brutschrank gestellt.

2.4.3 FACS/Durchflußzytometer

Nach 16 Stunden Stimulation wurde das Nährmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen mit dem Zellschaber vom Boden der Petrischalen gelöst, der Boden mit 1 ml PBS gespült und alles in ein 5 ml-Falcon überführt. Bei 1 100 rpm wurden die Falcons fünf Minuten zentrifugiert und anschließend das PBS abgesaugt. Nun wurden die Zellen in 50 μl frischem PBS aufgenommen und 10 μl anti-RAGE-Antikörper zugegeben. Das Ganze wurde für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Zusätzlich wurde eine Kontrolle (ungefärbte Probe) sowie eine mit IgG unspezifisch gefärbte Probe angelegt und mitgeführt. Dann wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (1 100 rpm, 5′). Für weitere 30 Minuten wurden die Zellen mit 50 μl des sekundären Antikörpers, anti-chicken, im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden wieder mit PBS gewaschen und dann mit 100 μl 1%igem Formalin in PBS-Analyseröhrchen pro Flasche fixiert (bei 4°C lagerbar). Die Proben wurden dann im Durchflußzytometer gemessen und ausgewertet.

2.4.4 Western-Blots

Dieses Kapitel wurde zur besseren Übersicht nochmals in Einzelarbeitsschritte gegliedert, entsprechend den Einzelschritten, wie die Versuche problemlos unterbrochen werden können.

Zelllyse

Nach 24 Stunden Stimulation wurde das Medium der Kulturen abgesaugt und die Zellen wurden einmal mit PBS (4°C) gewaschen. Anschließend wurde in die Schalen mit den Zellen jeweils 150 μl Lysepuffer (4°C) gegeben. Nach 10 Minuten Einwirkzeit wurden die lysierten Zellen mit dem Zellschaber vom Boden der Petrischalen abgeschabt und der Inhalt in Eppendorfgefäße überführt. Diese wurden bei 4°C für 15 Minuten mit 13 000 rpm zentrifugiert und der Überstand in „Eppendorfgefäße“ pipettiert.

Proteinassay

Um die Proteinmenge der Proben zu bestimmen, wurde mit 1:100 verdünntem Zelllysat pro Well ein Proteinassay angesetzt. Das dafür notwendige Chemolumineszenz-Reagenz wurde prozentual 50% (Reagenz A) zu 48% (Reagenz B) zu 2% (Reagenz C) eingesetzt. Zur Standardisierung wurde aus einem BSA-Stock 0,1 mg/ml eine Standardreihe von Zehnerschritten (blank bis 60 μg/ml) verwendet. Nach 2 Stunden Inkubation bei 37°C (wahlweise 1 Stunde/60°C oder ON/RT) erfolgte die Messung bei 490 nm.

Gel-Elektrophorese

Zunächst wurden anhand des Proteinassays den Zelllysaten eine Proteinmenge von 50 μg entnommen und in ein Eppendorfgefäß gebracht. Die Proben wurden dann mit H_2O auf gleiches Volumen eingestellt. 1/5 des Gesamtvolumens wurde als Loading-Buffer (5 $\times$) zugegeben. Nun wurden die Proben mittels Vortexer gemischt und 10 Minuten bei 100°C gekocht. Anschließend wurden die Proben kurz zentrifugiert und direkt in die trockenen Slots des Polyacrylamidgels pipettiert. Es wurde ein 10%iges Sample-Gel und ein 5%iges Stack-Gel verwendet. Die Kammer wurde nun mit Running-Buffer 1 $\times$ aufgefüllt und mit 110 V bei Raumtemperatur (wahlweise auch 4°C) gestartet.

Semidry-Blotting

Für das Blotten wurden eine Nitrocellulosemembran und zwei dicke Whatmanblätter in Gelgröße zugeschnitten und für fünf Minuten im 1 $\times$ Transferpuffer eingeweicht. Das Blotgerät wurde von unten nach oben zunächst mit einem Whatmanpapier, der Nitrocellulosemembran, dem Gel und wieder einem Whatmanpapier bestückt und bei 16 V für 45 Minuten gestartet. Die Nitrocellulosemembran wurde in PBST und 5% BSA wippend für eine Stunde bei Raumtemperatur (wahlweise ON bei 4°C) geblockt.

Staining

Der primäre Antikörper, anti-RAGE, wurde in PBST und 5% BSA für eine Stunde auf die Western-Membran gegeben. Es folgten fünf Waschschritte à 10 Minuten mit PBST und 5% BSA. Dann wurde der sekundäre Antikörper, anti-goat, ebenfalls in PBST und 5% BSA für eine Stunde auf die Western-Membran gegeben. Es

folgten wieder fünf Waschschritte à 10 Minuten mit PBST und 5% BSA. Nun wurde die Membran einmal mit reinem PBST gewaschen und dann für eine Minute in 8 ml Chemolumineszenz-Reagenz (4 ml Reagenz A und 4 ml Reagenz B) eingetaucht. Danach musste die Membran sofort auf einer Folie glatt ausgerollt und in (Frischhalte-)Folie eingepackt werden, bevor der eigentliche Röntgenfilm aufgelegt werden konnte (damit Reagenz A und B keine Reaktion mit dem frischen Röntgenfilm eingingen). Es wurden mindestens zwei Aufnahmen gemacht.

Strippen

Die gefärbten Western-Membranen wurden in 55°C heißer Stripping-Lösung auf einer Wippe für 15 Minuten inkubiert. Die Lösung wurde in fünf Schritten à 10 Minuten mit PBST (RT) ausgewaschen. Dann konnte die Membran in PBST und 5% Trockenmilch eine Stunde bei Raumtemperatur oder ON bei 4°C geblockt werden.

Jetzt konnte die Membran erneut mit Antikörpern markiert werden. Das zweite Staining erfolgte mit dem primären Antikörper anti-α-Tubulin und dem entsprechenden sekundären Antikörper anti-mouse jeweils in PBST und 5% Trockenmilch.

Densitometrie

Als letzter Schritt wurden alle so angefertigten Röntgenfilme einer quantitativen Messung der erreichten Farbdichte unterzogen. Hierzu wurden die Röntenfilme einzeln in das Densitometer eingelegt, in dem sowohl die Kalibrierung auf den Röntgenfilmhintergrund, als auch die anschließende Analyse der erreichten Farbdichte vollautomatisch erfolgte.

3 Ergebnisse

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden zwei Standardverfahren verwendet. Mit der FACS-Analyse (Synonym: durchflußzytometrische Analyse) wurden die auf der Oberfläche von humanen Endothelzellen exprimierten RAGE-Proteine quantitativ gemessen. Anhand der Western-Blot-Analysen konnte die endotheliale Gesamtproteinmenge an RAGE erfasst werden.

Es wurden für die Versuche humane Endothelzellen (ECs) eigens aus der V. saphena magna in den Passagen 2–5 verwendet. Von den Thiazolidindionen (TZDs) kamen Rosiglitazon (Rosi, BRL) und Pioglitazon (Pio) zum Einsatz. Für die Expressionsinduktion von RAGE an der Zelloberfläche der Endothelzellen wurde Tumor Nekrose Faktor-α (TNF-α) als Stimulans verwendet.

3.1 FACS-Analysen

Im ersten Schritt wurde die Wirkung von Thiazolidindionen auf die basale (physiologische) RAGE-Expression an der Oberfläche humaner Endothelzellen untersucht. Humane Endothelzellen wurden für je 16 Stunden mit je 10 μmol/l Rosiglitazon oder 10 μmol/l Pioglitazon stimuliert, mit entsprechenden Antikörpern markiert und anschließend einer FACS-Analyse unterzogen.

Sowohl unter der Zugabe von Rosiglitazon als auch von Pioglitazon zeigte sich eine signifikante Reduktion der basalen RAGE-Expression von 73±9% für Rosiglitazon, beziehungsweise 70±9% für Pioglitazon, im Vergleich mit unstimulierten Zellen (für beide $p<0.05$, n=5; siehe Abbildung 2A).

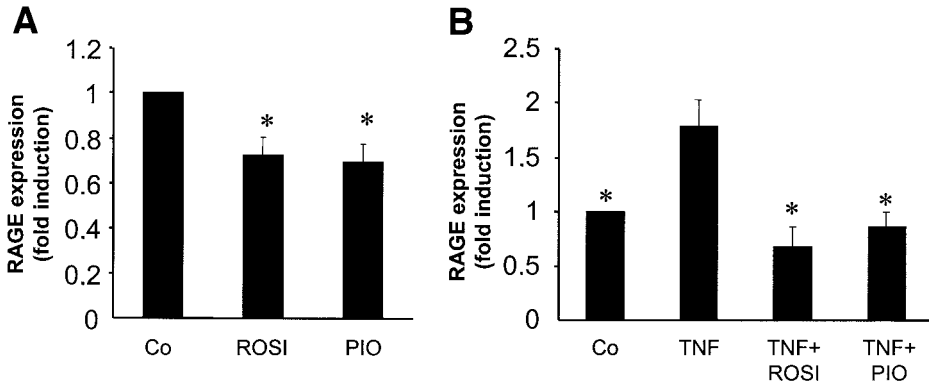


Abbildung 2. TZDs (Thiazolidindione) hemmen die endotheliale RAGE-Expression (receptor for advanced glycation endproducts). A: basale RAGE-Expression. Nach 16 Stunden Stimulation humaner ECs (endothelial cell) mit je 10 μmol/l Rosiglitazon (Rosi) beziehungsweise Pioglitazon (Pio) wurde die durchschnittliche Fluoreszenzintensität mittels FACS-Analyse (fluorescence-activated cell sorter) gemessen. Die Ergebnisse der FACS-Analysen sind im Verhältnis zur Kontrolle (= unstimulierte Zellen, Co) dargestellt. Die Säulen zeigen den Mittelwert/mean± die Standardabweichung/SEM (n=5). *$p<0.05$ im Vergleich zu unstimulierten Zellen. B: TNF-α-induzierte (Tumornekrose-Faktor-α) RAGE-Expression. Humane ECs wurden 16 Stunden mit TNF-α (25 ng/ml) alleine sowie mit Rosi oder Pio je 10 μmol/l stimuliert, anschließend erfolgte eine FACS-Analyse. Die Ergebnisse, das heißt die durchschnittliche Fluoreszenzintensität, sind im Verhältnis zur Kontrolle (= unstimulierte Zellen, Co) angegeben. Die Säulen zeigen den Mittelwert/mean± Standardabweichung/SEM (n=4). *$p<0.05$ im Vergleich zu unstimulierten Zellen.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Substanzen Rosiglitazon und Pioglita-

zon auch auf die TNF-α-induzierte RAGE-Expression eine hemmende Wirkung haben. Humane Endothelzellen wurden je 16 Stunden mit je 10 μmol/l Rosiglitazon oder 10 μmol/l Pioglitazon stimuliert. Diesmal wurde jedoch vorab je 25 ng/ml TNF-α zu den mit Rosiglitazon und Pioglitazon stimulierten Zellen hinzu gegeben, zusätzlich wurde eine zusätzliche Zellprobe nur mit 25 ng/ml TNF-α-Zugabe angelegt und mitgeführt. Anschließend wurden sie einer FACS-Analyse unterzogen. Es ließ sich nun anhand dieser FACS-Analysen zeigen, dass die Stimulation der Endothelzellen mit TNF-α mit 25 ng/ml dabei zu einem signifikanten Anstieg der RAGE-Expression an der Zelloberfläche auf das 1.8 ± 0.3–fache ($p < 0.05$, n=4) führt. Weiter ließ sich zeigen, dass sowohl Rosiglitazon wie auch Pioglitazon in der Lage sind, diesen Anstieg wieder signifikant zum Ausgangsniveau unstimulierter Zellen zu reduzieren ($p < 0.05$, für beide im Vergleich mit unstimulierten Zellen, n=4; siehe Abbildung 2B).

3.2 Western-Blots

Für die von Thiazolidindionen hervorgerufene Abnahme von RAGE-Protein an der Zelloberfläche, die mittels FACS-Analysen nachgewiesen werden konnte, sind verschiedene Mechanismen denkbar. Die Hypothese, dass es sich hierbei um eine Reduktion der Gesamtproteinmenge in der Zelle handelt, kann mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden. Auch hier wurden getrennte Versuche für die basale (physiologische) und für die TNF-α-induzierte RAGE-Expression durchgeführt.

Für die basalen Blots wurden humane Endothelzellen für je 16 Stunden mit je 10 μmol/l Rosiglitazon oder 10 μmol/l Pioglitazon stimuliert. Die Zelllysate wurden anschließend für den Western-Blot aufgearbeitet und es wurden dann die für die drei unabhängigen Versuche notwendige Blots erstellt. Eine gleiche Ladung an

intakten Proteinen wurde durch anschließende Färbung mit einem Antikörper gegen α-Tubulin nachgewiesen. Die Blots wurden im Anschluss densiometrisch gemessen und mit der α-Tubulin-Färbung abgeglichen. Auch hier kam es zu einer Reduktion der basalen RAGE-Proteinexpression unter Rosiglitazon und Pioglitazon im Vergleich zu unstimulierten Zellen (siehe Abbildung 3).

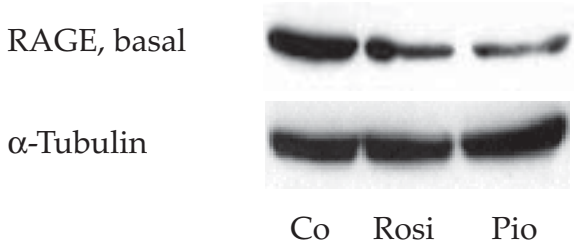


Abbildung 3. TZDs (Thiazolidindione) vermindern die basale Gesamtproteinmenge an RAGE (receptor for advanced glycation endproducts). Humane ECs (endothelial cell) wurden für 16 Stunden mit je 10 μmol/l Rosi (Rosiglitazon) beziehungsweise Pio (Pioglitazon) stimuliert, anschließend durchgeführte Western-Blots zeigen eine Abnahme der RAGE-Proteinkonzentration. Die Gegenfärbung mit α-Tubulin zeigt gleiche Ladung intakten Proteins.

Entsprechend der FACS-Analyse wurde nun untersucht, ob die Reduktion der Gesamtproteinmenge durch Thiazolidindione auch bei der TNF-α-induzierten RAGE-Expression möglich ist.Auch hier zeigte sich, das Rosiglitazone und Pioglitazone die TNF-α-induzierte RAGE-Expression reduzierten (siehe Abbildung 4).

Abschließend war die Frage zu klären, ob dieser Effekt eine charakteristische Dosiswirkungsabhängigkeit aufweist. Es zeigte sich eine Dosisabhängigkeit der Inhibition der RAGE-Expression. Die maximale Reduktion lag dabei bei 40$\pm$9% für 10μmol/l Rosiglitazon (siehe Abbildung 5und 6) und bei 63$\pm$9% für 10μM Pioglitazone.

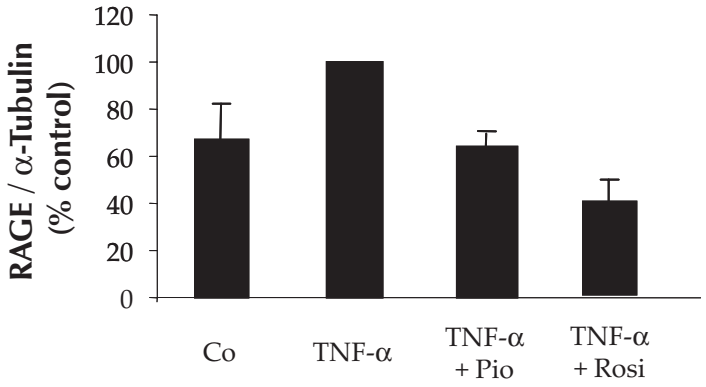


Abbildung 4. TZDs (Thiazolidindione) vermindern die TNF-α-induzierte (Tumornekrose-Faktor-α) Gesamtproteinmenge an RAGE (receptor for advanced glycation endproducts). Humane ECs (endothelial cell) wurden für 16 Stunden mit TNF-α (25 ng/ml) alleine und je 10 μmol/l Rosi (Rosiglitazon) beziehungsweise Pio (Pioglitazon) stimuliert. Densitometrisch zeigt sich eine Abnahme der RAGE-Proteinkonzentration.

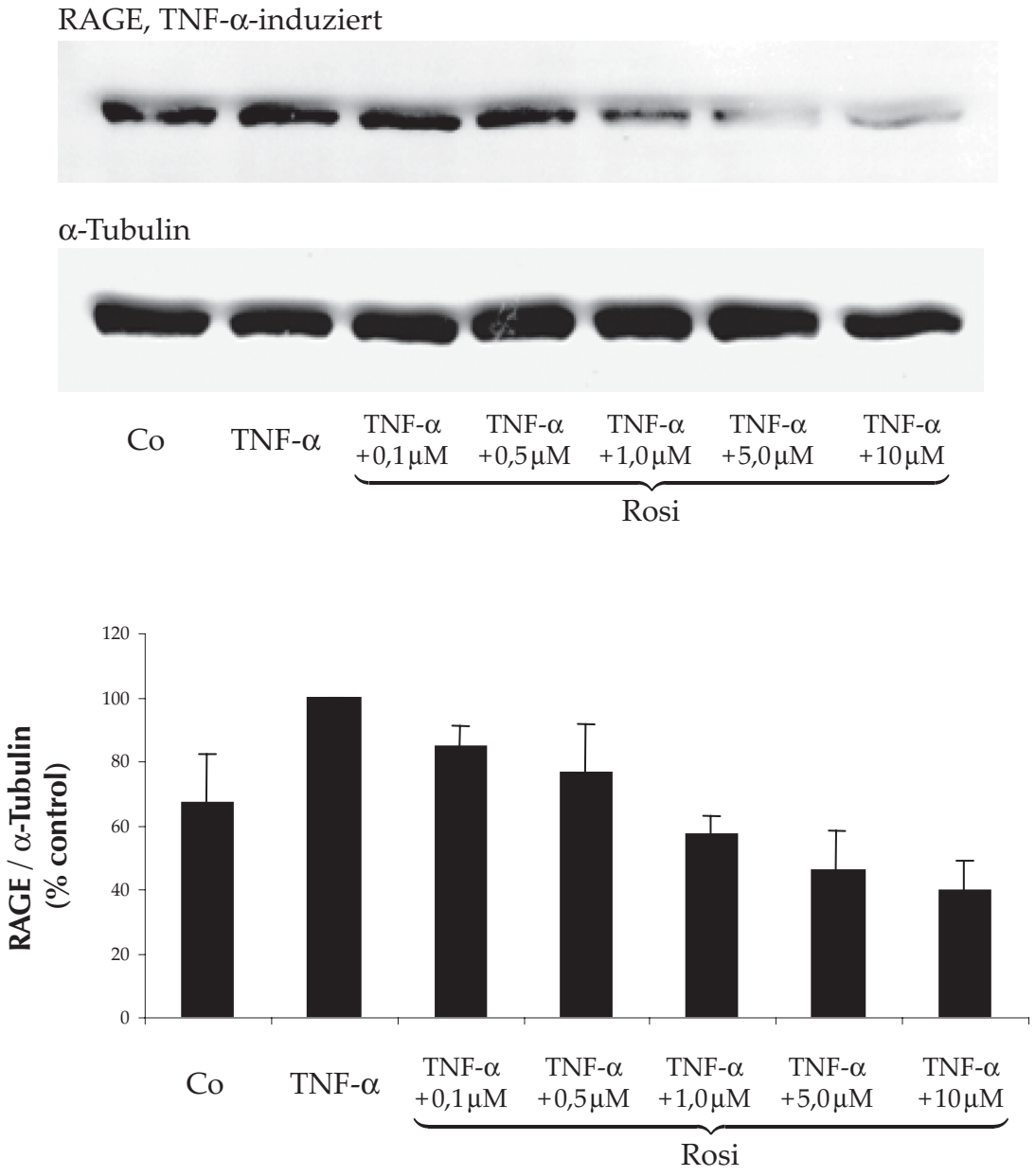


Abbildung 5. TZDs (Thiazolidindione) vermindern die TNF-α-induzierte (Tumornekrose-Faktor-α) Gesamtproteinmenge an RAGE (receptor for advanced glycation endproducts) dosisabhängig. Humane ECs (endothelial cell) wurden für 16 Stunden mit TNF-α (25 ng/ml) und aufsteigender Dosis Rosiglitazon (0,1, 0,5, 1,0, 5,0 und 10,0 μmol/l) stimuliert, davon erstellte Western-Blots zeigen eine dosisabhängige Reduktion der RAGE-Proteinexpression. Die Gegenfärbung mit α-Tubulin diente als Ladungskontrolle. Die Densitometrie zeigt eine Dosisreduktion.

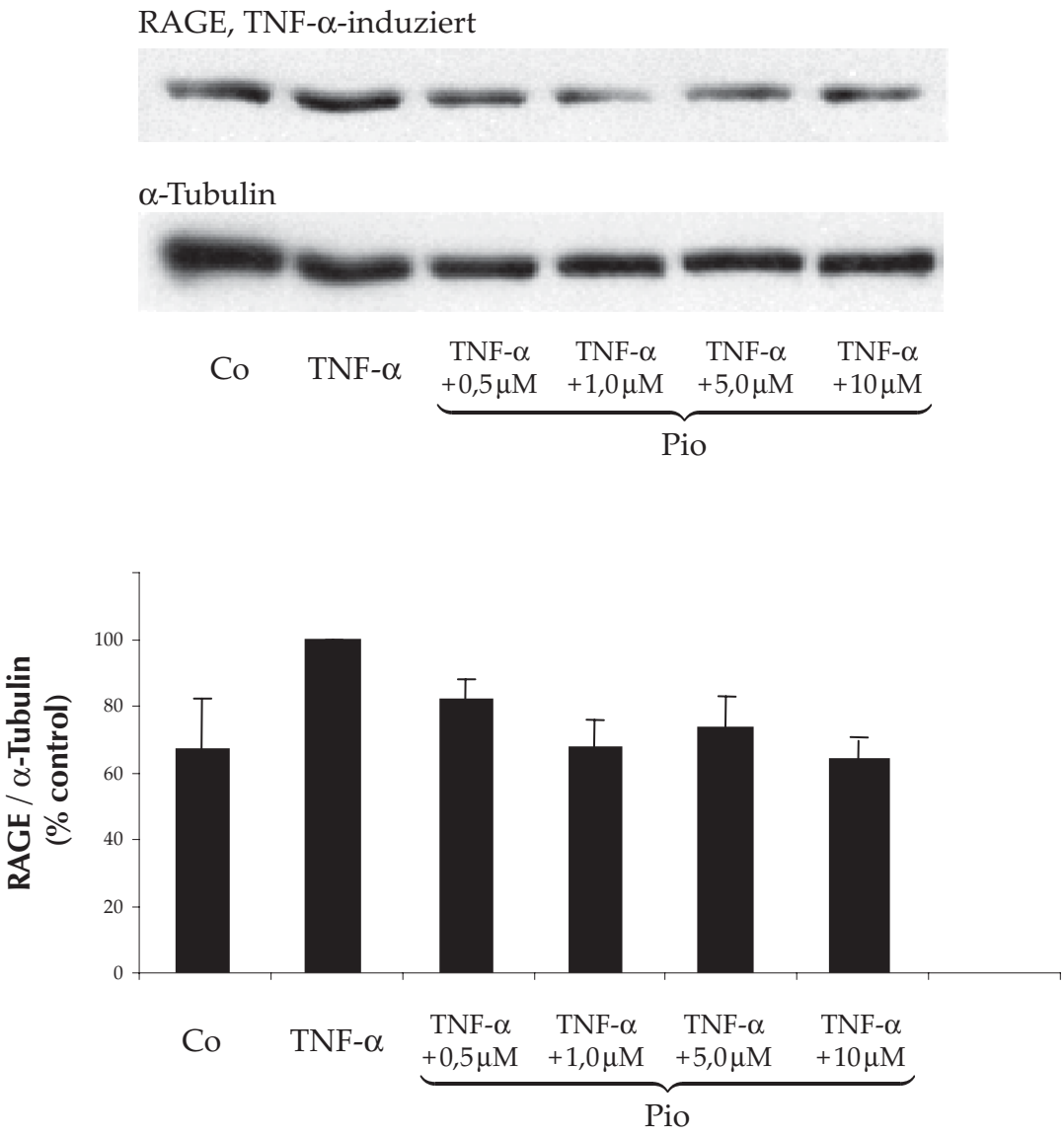


Abbildung 6. TZDs (Thiazolidindione) vermindern die TNF-α-induzierte (Tumornekrose-Faktor-α) Gesamtproteinmenge an RAGE (receptor for advanced glycation endproducts) dosisabhängig. Humane ECs (endothelial cell) wurden für 16 Stunden mit TNF-α (25 ng/ml) und aufsteigender Dosis Pioglitazon (0,5, 1,0, 5,0 und 10,0 μmol/l) stimuliert, davon erstellte Western-Blots zeigen eine dosisabhängige Reduktion der RAGE-Proteinexpression. Die Gegenfärbung mit α-Tubulin diente als Ladungskontrolle. Die Densitometrie zeigt eine Dosisreduktion.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die endotheliale RAGE-Expression in humanen Endothelzellen durch PPARγ-aktivierende Glitazone signifikant reduziert werden kann. Diese Inhibition zeigte eine Dosisabhängigkeit.

4.1 Bewertung der Effekte von molekularen Thiazolidindionen

Heute weiß man, dass ein Teil der Arteriosklerose entstehung in der Intima der Gefäße über die Aktivierung des RAGE-Rezeptors durch AGEs und nachfolgender Beeinflussung der Genexpression von Cytokinen und Chemokinen von statten geht. Nachdem die Thiazolidindione primär als Regulatoren in der Genexpression des Glukosestoffwechsels und der Adipogenese eingestuft wurden, erkannte man kürzlich, dass sie auch als Genregulatoren Einfluss auf das Geschehen in vaskulären Zellen, wie beispielsweise den endothelialen Zellen, nehmen [27, 78, 74]. Die Wirkung der Thiazolidindione beruht dabei auf einer Aktivierung der nukleären PPARs. Auch von der Familie der PPARs an sich weiß man heute, dass ihnen eine entscheidende Rolle im Prozess der Arteriosklerose zukommt. Inwiefern jedoch die Wirkmechanismen der PPARγs in die RAGE-Expression und dessen weitere Si-

gnalkette eingreifen, ob sie miteinander verknüpft sind und somit ein unmittelbarer Zusammenhang besteht, darüber ist bisher nichts bekannt. So stellte sich zu Beginn dieser Arbeit primär die Frage: Haben Thiazolidindione als Aktivatoren der PPARs einen Einfluss auf die RAGE-Expression von vaskulären Zellen? Es sollte dabei zunächst untersucht werden, ob Thiazolidindione überhaupt die Eigenschaft besitzen, Einfluss auf die Expression von RAGE-Proteinen an der Zelloberfläche von Endothelzellen zu nehmen, sodass der Zusammenhang der bisher bekannten Mechanismen hergestellt wird, indem die Verknüpfung der Signalwege belegt wird. Später sollten die Details dieser Eigenschaft weiter untersucht werden und mit diesen Experimenten soll die Rolle der Thiazolidindionen in Bezug auf die Arteriosklerose gleichzeitig weiter charakterisiert werden.

Aufgrund der bekannten Literatur ist, wenn überhaupt, am ehesten von einem hemmenden Effekt von Thiazolidindionen auf die RAGE-Rezeptoren auszugehen. Neben der Ausgangshypothese, ob PPARγ-Aktivatoren in der Lage sind, die Down-Regulation des RAGE-Rezeptors zu vermitteln, sollte festgestellt werden, ob sie dies möglicherweise in einer charakteristischen Weise, dass heißt dosisabhängig und dann mit einer ausreichend großen therapeutischen Breite tun. Darüber hinaus interessierte, wenn sie dies tun, auf welcher Ebene eine Down-Regulation von RAGE stattfindet. Mögliche Ebenen sind:

- Eine Reduktion der Rezeptoren an der Zelloberfläche, zum Beispiel durch einem verminderten Einbau in die Zellmembran.
- Eine Reduktion der Proteine im Zytosol, wie es zum Beispiel durch Denaturierung geschieht.
- Eine Hemmung des RAGE-Gens auf der RNA-Ebene, so dass die Synthese des RAGE-Proteins zum Erliegen kommt.

- Es liegt ein zytotoxischer Effekt zugrunde.

Mit dieser Arbeit konnten schrittweise Belege zur Beantwortung dieser Fragen gefunden werden. Dass die Versuche an intakten synthesefähigen Zellen verliefen, konnte dabei anhand einer alleinigen Vorbehandlung der Zellen mit dem Stimulans TNF-α, welches zu einer deutlichen Synthesesteigerung führte, gezeigt werden (siehe Abbildung 2). Bezüglich der Fragestellung zeigte sich, dass beide hier verwendeten Testsubstanzen in der Lage sind, die RAGE-Oberflächenproteine sowohl basal, als auch nach einer Induktion, signifikant zu senken (siehe Seite 27). Dabei war die Wirkung prozentual größer, wenn sie mit TNF-α vorstimuliert wurden und beide Substanzen waren in der Lage, die RAGE-Expression zum Ausgangsniveau unstimulierter Zellen zu reduzieren.

Da mittels Western-Blot-Analysen die Gesamtproteinmenge detektiert werden kann, konnte mit ihnen gezeigt werden, dass dies auf einer Abnahme der Gesamtproteinmenge beruhen muß: Nach der Behandlung mit beiden Testsubstanzen zeigte sich im Western-Blot sowohl die basale wie auch die induzierte RAGE-Proteinmenge vermindert (siehe Seite 29). Dass diese Proteinreduktion nicht auf eine Veränderung der Lebensfähigkeit der Zellen, sprich auf einen zytotoxischen Effekt, oder aber auch auf einer generellen Inhibition der Proteinsynthese zurückzuführen ist, wurde vorab ausgeschlossen: In separaten Versuchen wurden Endothelzellen nach Thiazolidindionbehandlung mit Tryptophanblau angefärbt und die Gesamtproteinsynthese durch ^{S35}-Methionin-Markierung und anschließender Trichloressigsäure-Präzipitation kontrolliert. Hier zeigte sich, dass Thiazolidindione weder die Vitalität der Zellen beeinflussen, noch dass sie die Proteinsynthese hemmen. Es konnte somit aus den Western-Blot-Analysen geschlossen werden, dass der Abnahme von RAGE an der Zelloberfläche eine Abnahme der Gesamtproteinmenge an synthetisiertem RAGE-Protein zugrunde liegt und es nicht

nur daran liegt, dass RAGE vermindert in der Zellwand eingebaut wird. Mit dieser Arbeit konnten jedoch noch keine sicheren Belege erbracht werden, dass es sich hierbei tatsächlich um PPAR-vermittelte Effekte auf Genebene handelt. Dazu bedarf es weiterer Versuche mit anderen Methoden. Dennoch gibt es anhand dieser Arbeit indirekte Hinweise auf diesen Zusammenhang: Zum einen kann über die Dauer der notwendigen Vorbehandlung mit den Inhibitoren der RAGE-Expression, bei der eine Reduktion von RAGE messbar wird, auf die zugrunde liegenden Mechanismen geschlossen werden. So sind bei den meisten rezeptorvermittelten Wirkungen die Zeiten bis zum Wirkeintritt bekannt. Bei den intrazellulären Rezeptoren, wie es die Steroidrezeptoren und damit auch die PPARs sind, liegt die Stimulationsdauer im Zeitraum von mehreren Stunden. Es liegt daher nahe, dass die Signaltransduktion somit über diese vermittelt werden könnte. Auch vermag diese Arbeit nicht zu zeigen, dass es sich hier tatsächlich um ein Geschehen handelt, welches speziell von PPARγ vermittelt wird. Interessanterweise deuten aber zeitgleich durchgeführte Untersuchungen stark darauf hin: Alle hier gezeigten Versuche wurden parallel mit zwei weiteren Testsubstanzen, Fenofibrat und WY14643, durchgeführt, das heißt unter den selben Versuchsbedingungen. Dabei sind Fenofibrat und WY14643 reine PPARα-Aktivatoren, Pioglitazon ist ein gemischter PPARα- und PPARγ-Aktivator und Rosiglitazon ist ein reiner PPARγ-Aktivator. Die Daten zeigten, dass weder Fenofibrat noch WY14643 in der Lage sind, RAGE signifikant zu senken. Dies weist auf eine hier vorliegende Vermittlung des Effekts über den Rezeptorsubtyp PPARγ hin.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sich die RAGE-Synthese durch Thiazolidindione regulieren lässt, wurde der Fokus nun auf verschiedene Dosierungen gesetzt, um herauszufinden, wie viel Testsubstanz notwendig ist, um diesen Effekt hervorzurufen. Die Rezeptorenanzahl jeder einzelnen Zelle ist begrenzt, so dass die Bildung des Liganden-Rezeptor-Komplexes sättigbar ist und sich eine für je-

den Rezeptor und jeden Aktivator eine eigene charakteristische Dosis-Wirkungs-Kurve aufstellen lässt. Von besonderem Interesse ist dabei vor allem die therapeutische Breite, da sie ein Maß für die Sicherheit zwischen therapeutischer und toxischer Wirkung darstellt und den Abstand zwischen der minimal wirksamsten und ersten toxischen Dosis festlegt. Dass es sich hier tatsächlich um eine charakteristische Dosis-Wirkungs-Kurve mit einer relativ großen therapeutischen Breite handelt, wurde an der induzierten RAGE-Reduktion mittels Western-Blot-Analysen für Rosiglitazon gezeigt.

Zusammenfassend ließ sich somit zeigen, dass in humanen Endothelzellen nach Behandlung mit Thiazolidindionen die AGE-Rezeptoren an der Oberfläche vermindert sind, gleichzeitig jedoch auch die freie RAGE-Gesamtproteinmenge signifikant abgenommen hat und dieses wahrscheinlich auf einen dosisabhängigen PPARγ-vermittelten Effekt auf Genebene beruht. Weiterhin ist jedoch offen, ob dies wie vermutet an einer Verminderung der m-RNA von RAGE liegt. Hierzu müsste man beispielsweise gleiche Versuche mittels Northern-Blot-Analysen untersuchen. Hierzu existieren bereits Daten, welche auch hier eine signifikante Reduktion der m-RNA von RAGE belegen [83]. Demzufolge findet entsprechend der Hypothese die Hemmung von RAGE bereits auf Genebene statt. Inzwischen weiß man sogar aus EMSA- Analyse (Electrophoretic mobility shift assay), dass beide Substanzen die NF-κB-Proteinbindung an der proximalen NF-κB-Seite des RAGE-Promotors hemmen [83]. Schließlich interessiert, ob eine Thiazolidindion-vermittelte RAGE-Reduktion nun tatsächlich auch einen antiatherogenen Effekt hat, das heißt die proinflammatorischen AGE-Effekte senkt, wie es im Tiermodel bereits gezeigt werden konnte. Weitere invitro-Untersuchungen konnten zeigen, daß Glitazone die AGE-induzierte MCP-1-sekretion in Endothelzellen signifikant reduziert [83].

Zum jetzigen Zeitpunkt läßt sich mit den Daten dieser Arbeit und den bisherigen Erkenntnissen aus der Literatur die initiale Hypothese belegen: Thiazolidindione

reduzieren RAGE-Rezeptoren auf Genebene durch PPARγ-Aktivation und senken damit letztendlich die Zellsensitivität für proinflammatorische AGE-Aktivierung. Die Thiazolidindione könnten somit eventuell neben ihren metabolischen Effekten im Glukose- und Lipidstoffwechsel wichtige potentielle Regulatoren für die Arteriosklerose werden. Ausblickend stehen eine ganze Reihe weiterer PPARγ-vermittelter Eigenschaften im Raum, die man den Thiazolidindionen zuschreiben könnte. Beispielsweise inhibiert Troglitazon im Rattenmodel die Intimahyperplasie und PPARγ-Aktivation senkt die Expression und Aktivität von Matrixmetalloproteinasen. Zusammenfassend könnten die Thiazolidindione auf diese Weise am Ort des atherosklerotischen Geschehens breit und kausal eingreifen, indem sie die Angriffsfläche der proinflammatorischen und koagulatorischen Prozesse reduzieren. Bevor man jedoch die Thiazolidindione als Antiatherosklerotika verwendet, bleibt vor allem zu untersuchen, ob sich diese in vitro erhobenen Daten auch in vivo in gleichem Ausmaß zeigen. Dennoch ist diese Übertragbarkeit auf den Menschen offen.

4.2 Pathophysiologische Relevanz der Ergebnisse

Neben den bisher gewonnenen Erkenntnissen über ihren molekularen Wirkmechanismus stehen die Daten dieser Arbeit im Einklang mit anderen pathophysiologisch interessanten Glitazoneffekten.

Bei den Glitazonen lassen sich nach neuesten Erkenntnissen indirekte Effekte und direkte Effekte unterscheiden. Bisher werden die Thiazolidindione im klinischen Alltag nur aufgrund ihrer indirekten metabolischen Wirkung als Insulinsensitizer eingesetzt. Das heißt, es handelt sich hier um eine Medikamentengruppe, welche speziell für den Diabetes mellitus Typ 2 entwickelt wurde, um erstmals kausal Ein-

fluss auf die hier vorliegende periphere Insulinresistenz zu nehmen. Bei der Insulinresistenz ist die Übertragung des Insulinsignals vom zellulären Insulinrezeptor zu Strukturen innerhalb der Zelle gestört. Glitazone sind nun in der Lage, diese über die intrazellulären Signalblockaden in weiten Teilen wieder aufzuheben und verbessern so die Insulinwirkung. Dies geschieht über Gene, welche über PPARγ von Glitazonen reguliert werden. Es handelt sich hierbei um Gene, welche für

- die Insulinsensitivität beziehungsweise Insulinresistenz
- den Glukosestoffwechsel
- die Adipogenese und
- den Lipid- beziehungsweise den Lipoproteinstoffwechsel

eine Rolle spielen. Darüber hinaus mehren sich nun Daten, dass die Glitazone über den selben molekularen Wirkmechanismus bereits direkte Effekte auf die Zellen und Strukturen haben, in denen sie exprimiert werden. Beispielsweise wird der Glitazon-Rezeptor PPARγ auch in Zellen der Gefäßwand nachgewiesen [82, 76]: in den gefäßauskleidenden Endothelzellen, den glatten Gefäßmuskelzellen und in Entzündungszellen, die in die Gefäßwand einwandern (Monozyten, T-Lymphozyten). Da alle diese Zellen für den Prozess der Arteriosklerose-Entstehung von besonderer Bedeutung sind, legt das Vorhandensein des Rezeptors PPARγ in der Gefäßwand nahe, dass Glitazone möglicherweise regulierend in den Prozess der Arteriosklerose eingreifen. Bisher konnte man bereits mehrere positive Glitazoneffekte auf vaskulärer Ebene nachweisen. So beeinflussen Glitazone verschiedene Prozesse in allen Phasen der Atherogenese:

In der Phase der endothelialen Dysfunktion verhindern Glitazone beispielsweise die Freisetzung chemotaktisch wirksamer Stoffe aus dem Endothel und reduzieren so das Anlocken von Monozyten und T-Zellen [54, 58, 78]. Die Aktivierung

von PPARγ durch Glitazone hemmt auch die Expression von Adhäsionsmolekülen, die für das Einwandern der Entzündungszellen in die Gefäßwand bedeutsam sind [23, 53]. Ebenso wird die Bildung des proatherogenen Mediators Endothelin-1 durch Glitazone verringert [52, 71, 112]. Das Peptid Endothelin-1 (ET-1) fördert die Expression der Adhäsionsmoleküle auf der Endothelzelloberfläche und hat darüber hinaus eine vasokonstriktive Wirkung auf die Blutgefäße. In der Phase der Fatty-Streak-Formation konnte gezeigt werden, dass Glitazone die Migration glatter Gefäßmuskelzellen inhibieren [29, 51, 80, 105]. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Glitazone die Einwanderung glatter Gefäßmuskelzellen aus der Media in die Intima verhindern und so dem Atherogeneseprozess weiterhin entgegenwirken. Aus klinischer Sicht könnte dieser Mechanismus außerdem bedeuten, dass Glitazone zum Beispiel auch bei der Restenoseentstehung nach Koronarangioplastie modulierend eingreifen, da die Muskelzellmigration auch hier von entscheidender Bedeutung ist. Daneben ist in der Phase der Fatty-Streak-Formation auch die Aktivierung von T-Zellen mit konsekutiver Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren, wie Interferonγ und TNF-α, ein entscheidender Faktor der Atherogenese. Sowohl Pioglitazon wie auch Rosiglitazon hemmen die Freisetzung dieser Botenstoffe und wirken damit an einer zentralen Schaltstelle der Läsionsentstehung antiinflammatorisch und antiatherogen [77, 119]. Selbst in den fortgeschrittenen Atherogenesestadien zeigen Glitazone einen positiven plaquestabilisierenden Effekt. Hier wirken sie durch eine Verminderung der Freisetzung von Metalloproteinasen (matrixdegradierende Enzyme) aus Makrophagen und Schaumzellen einer Plaquedestabilisierung mit Matrixabbau und Ausdünnung der fibrösen Kappe entgegen [75, 82].

Des Weiteren kann man bereits antiinflammatorische und antiatherogene Effekte von Glitazonen bei behandelten Patienten mit Glitazonen feststellen. Messbar ist dies über so genannte inflammatorische Surrogatparameter der Arteriosklerose. Die in den Atherogeneseprozess involvierten Entzündungs-Mediatoren, wie Cy-

tokine und Chemokine, finden sich nicht nur in der Gefäßwand, sondern werden auch ins Blut abgegeben. Hier führen sie, dies gilt beispielsweise für Interleukin-6 oder TNF-α, zu einer Induktion von Akutphase-Proteinen, wie C-reaktives Protein, Fibrinogen oder Serum-Amyloid A. Studien aus den letzten Jahren konnten belegen, dass erhöhte Werte des C-reaktiven Proteins prädiktiv für das Auftreten makrovaskulärer Ereignisse ist [96]. Verschiedene Untersuchungen zeigten nun, dass Pioglitazon und Rosiglitazone bei behandelten Patienten zu einer signifikanten Reduktion des C-reaktiven Proteins führten, sowie in der Lage sind, Serum-Amyloid A oder TNF-α zu senken [42, 113, 124]. Da diese Effekte bereits nach einer zweiwöchigen Therapie auftreten, wohingegen sich eine relevante blutzuckersenkende Wirkung dieser Substanzen erst nach sechs bis acht Wochen bemerkbar macht, läßt vermuten, dass die antiinflammatorischen Effekte von Glitazonen unabhängig von der metabolischen Wirkung sind. Gestützt wird diese Theorie durch Untersuchungen an nicht-diabetischen Patienten mit koronarer Herzkrankheit und Glitazonbehandelten Typ-2-Diabetikern, die auch bei Nicht-Ansprechen auf die blutzuckersenkende Wirksamkeit (so genannte Non-Responder) antiinflammatorische Effekte zeigten [113, 124].

Ein weiterer prädiktiver Wert für das Auftreten von makrovaskulären Ereignissen, bei denen Glitazone ebenfalls einen positiven vaskuloprotektiven Effekt zeigen, ist die Bestimmung der flussabhängigen endothelialen Vasodilatation. Mit ihr kann man das Ausmaß der endothelialen Dysfunktion erfassen. Studien hierzu belegen, dass eine Therapie mit Glitazonen in der Lage ist, eine signifikante Verbesserung der endothelabhängigen Vasodilataion zu erreichen [24, 93, 106, 131]. Auch hier scheint der Effekt unabhängig von der metabolischen Wirkung der Substanzen aufzutreten, da er auch bei Nicht-Diabetikern messbar ist [46]. Neben der endothelialen Vasodilatation kann man die endotheliale Dysfunktion auch am Ausmaß der Mikroalbuminurie messen. Auch hier konnte man unter einer Therapie mit Rosi-

glitazon oder Pioglitazon eine Reduktion der Urin-Albumin-Ausscheidung nachweisen [2, 44, 92, 91]. Der günstige Einfluß der Glitazone auf die Endothelfunktion läßt sich nach wenigen Monaten mit einer Glitazontherapie bereits am Surrogatparameter der Intima-Media-Dicke, welcher für das Arteriosklerose-Ausmaß und das makrovaskuläre Risiko steht, messen. Hierzu erstellte Studien zeigen, dass Glitazone im Bereich der Arteria carotis unabhängig von der metabolischen Wirkung zu einer signifikanten strukturellen Veränderung der Gefäßwand durch eine Reduktion der IMT führen [61, 63, 91, 125].

Schließlich untersuchte man auch den Effekt von Glitazonen auf die Restenoserate nach einer Koronarangioplastie. Hier zeigen vor allem Patienten mit Typ-2-Diabetes ein deutlich erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Restenose nach dem Eingriff. Die zellulären Prozesse der Restenosierung sind den Vorgängen bei der Atherogenese ähnlich. Studien mit einer sechsmonatigen Therapie mit Pioglitazon oder Rosiglitazon zeigen, dass die Neo-Intima-Formation im Stent und auch die Restenoserate bei Nicht-Diabetikern signifikant abnimmt [20, 84, 132].

4.3 Fazit und Ausblick für die Zukunft

Faßt man alle bislang verfügbaren Daten zusammen, so legen diese Daten nahe, dass Glitazone neben dem metabolischen Effekt der Insulinsensitizer einen hiervon unabhängigen direkten Einfluss auf die Gefäßwand haben. Durch die Aktivierung von PPARγ entfalten sie antiinflammatorische Effekte direkt vor Ort, die durch das Eingreifen in allen Stadien der Atherogenese zu einer Verbesserung der Endothelfunktion mit konsekutiver Verbesserung der strukturellen Gefäßsituation im Sinne einer Arteriosklerose-Regression oder auch Restenose-Prävention nach koronarer Intervention führen kann. Sie besitzen also möglicherweise neben der Eigenschaft

als Insulinsensitizer eine weitere als Vaskuloprotektiva. In der PROactive Studie konnte mittlerweile dieser Effekt auf makrovaskuläre Ereignisse gezeigt werden. Pioglitazon hat hier den Endpunkt bestehend aus Mortalität, Infarkt und Insult bei Hochrisiko-Patienten mit Typ 2-Diabetes reduziert.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersuchte, ob Thiazolidindione die Expression des RAGE-Rezeptors (receptor for advanced glycation endproducts) regulieren können. Methodisch zum Einsatz kamen FACS- (fluorescence-activated cell sorter)und Western-Blot-Analysen. Die Versuche wurden an humanen Endothelzellen durchgeführt. Von den Glitazonen wurden Rosiglitazon und Pioglitazon eingesetzt. TNF-α (Tumornekrose-Faktor-α) diente als natürliches RAGE-Stimulans. Es konnte gezeigt werden, dass Thiazolidindione die basale RAGE-Expression reduzieren und Thiazolidindione die TNF-α-induzierte RAGE-Expression reduzieren. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass die RAGE-Reduktion nicht nur an der Zelloberfläche, sondern auch auf Proteinebene statt findet und, dass die RAGE-Reduktion dosisabhängig erfolgt.

Geht man davon aus, dass weniger RAGE an der Zelloberfläche gleichbedeutend ist mit weniger atherosklerotischer Wirkung, zeigen Thiazolidindione in vitro eine RAGE-reduzierende atheroprotektive Wirkung. Dies stellt in der Behandlung der Folgeerkrankungen des Typ 2 Diabetikers erstmals einen neuen kausalen Therapieansatz zur Bekämpfung der Atherosklerose dar. Diese Arbeit trägt somit zum Verständnis der Glitazonwirkung auf vaskulären Zellen bei.

Literaturverzeichnis

[1] Abel M, Ritthalter U, Zhang Y, Deng Y, Schmidt AM, Greten J, Sernau T, Wahl P, Andrassy K, Ritz E, Waldherr R, Stern DM, Nawroth PP: Expression of receptors for advanced glycosylated end products in renal disease. Nephrol Dial Transplant 10: 1662–1667 (1995)

[2] Bakris G, Viberti G, Weston WM, Heise M, Porter LE, Freed MI: Rosiglitazone reduces urinary albumin excretion in type II diabetes. J Hum Hypertension 17: 7–12 (2003)

[3] Bakst A, Schwartz S, Fischer JS: Avandia Worldwide Awareness Registry: improved metabolic control with initiation of rosiglitazone in a diabetes clinic setting [abstract no. 1791-PO]. Diabetes 50 suppl. 2: 430 (2001)

[4] Balfour JA, Plosker GL: Rosiglitazone. Drugs 57: 921–930 (1999)

[5] Banerji M, Lebovitz H, Dugbartey M: Rosiglitazone selectively increases subcutaneous but not visceral adipose tissue mass in type 2 diabetes mellitus [abstract no. 356-P]. Diabetes 50 suppl. 2: 90 (2001)

[6] Barman-Balfour JA, Plosker GL: Rosiglitazone. Drugs 57: 921–930 (1999)

[7] Baumgartl H, Standl E: „Advanced glycation end products“ und deren Folgen für die diabetischen Folgeschäden. Diab Stoffw 177–182 (1996)

[8] Beebe KL: Rosiglitazone is effective and well tolerated in patients $>$ 65 years with type II diabetes. Diabetes 49 suppl. 1: 854–854 (1999)

[9] Berger J, Bailey P, Biswas C, Cullinan CA, Doebber TW, Hayes NS, Saperstein R, Smith RG, Leibowitz MD: Thiazolidinediones produce a conformational change in peroxisomal proliferator-activated receptor-γ: binding and activation correlate with antidiabetic actions in db/db mice. Endocrinology 137: 4189–4195 (1996)

[10] Bierhaus A, Chevion S, Chevion M, Hoffmann M, Quehenberger P, Illmer T, Luther T, Berentshtein E, Tritschler T, Muller M, Wahl P, Ziegler R, Nawroth PP: Advanced glycation endproduct-induced activation of NF-kappa B is suppressed by alpha-lipoic acid in cultured endothelial cells. Diabetes 46: 1481–1490 (1997)

[11] Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, Nawroth PP: AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. Cardiovasc Res 37: 586–600 (1998)

[12] Bierhaus A, Illner T, Kasper M, Luther T, Quehenberger P, Tritschler H, Wahl P, Ziegler R, Müller M, Nawroth PP: Advanced glycation endproducts (AGEs) mediated induction of tissue factor in cultured endothelial cells is dependent on RAGE. Circulation 96: 2262–2271 (1997)

[13] Bierhaus A, Ritz E, Nawroth PP: Expression of receptors for advanced glycation end-products in occlusive vascular and renal disease [abstract]. Nephrol Dial Transplant 11 suppl. 5: 87–90 (1996)

[14] Biermann EL: George Lyman Duff Memorial Lecture. Atherogenesis in diabetes. Arterioscler Thromb 12: 647–656 (1992)

[15] Brett J, Schmidt AM, Yan SD, Zou YS, Weidemann E, Pinsky D, Nowygrad R, Neeper M, Przysiecki C, Shaw A: Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. Am J Pathol 143: 1699–1712 (1993)

[16] Brownlee M: Advanced glycation end products in diabetic complications. Curr Opin Endocr Diab 3: 291–297 (1996)

[17] Brunmair B, Gras F, Neschen S, Roden M, Wagner L, Waldhäusl W, Fürnsinn C: Direct thiazolidinedione action on isolated rat skeletal muscle fuel handling is independent of peroxisome proliferator-activated receptor-γ-mediated changes in gene expression. Diabetes 50: 2309–2315 (2001)

[18] Carey DG, Cowin GJ, Galloway GJ, Jones NP, Richards JC, Biswas N, Doddrell DM: Effect of rosiglitazone on insulin and body composition in type 2 diabetic patients. Obes Res 10: 1008–1015 (2002)

[19] Chappey O, Dosquet C, Wautier M, Wautier J: Advanced glycation end products, oxidant stress and vascular lesion. Eur J Clin Invest 27: 97–108 (1997)

[20] Choi D, Kim SK, Choi SH, Ko YG, Ahn CW, Jang Y, Lim SK, Lee HC, Cha BS: Preventative effects of rosiglitazone on restenosis after coronary stent implantation in patients with type 2 diabetes. Diabetes Care 27: 2654–2660 (2004)

[21] Cominacini L, Garbin U, Pasini AF, Campagnola M, Davoli A, Foot E, Sighieri G, Sironi AM, Cascio VL, Ferrannini E: Troglitazone reduces LDL oxidation and lowers plasma E-selectin concentration in NIDDM patients. Diabetes 47: 130–133 (1998)

[22] Cortellaro M, Confrancesco M, Boschetti C, Mussoni L, Donati MB, Cardillo M, Catalano M, Gabrilli L, Lombardi B, Specchia G: Increased fibrin turnover and high PAI-1 activity as predictors of ischemic events in atherosclerotic patients. A case-control study. The PLAT Group. Arterioscler Thromb 13: 1412–1417 (1993)

[23] Cuzzocrea S, Pisano B, Dujo L, Ianaro A, Maffia P, Patel NS, Di Paola R, Ialenti A, Genovese T, Chatterjee PK, Di Rosa M, Caputi AP, Thiemermann C: Rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, reduces acute inflammation. Eur J Pharmacol 483: 79–93 (2004)

[24] Dandona P, Aljada A: Endothelial dysfunktion in patients with type 2 diatetes and the effects of thiazolidinedione antidiabetics agents. J Diabetes Complications 18: 91–102 (2004)

[25] Dandona P, Mohanty P, Aljada A, Ghanim H, Had-dad W: Evidence of a potent anti-inflammatory effect of rosiglitazone in mononuclear cells [abstract no. 136]. Diabetologia 44 suppl. 1: A36–A36 (2001)

[26] Delerive P, de Bosscher K, Besenard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gnonzalez FJ, Fruchart JC, Tedgui A, Haegeman G, Steals G: Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. J Biol Chem 274: 32048–32054 (1999)

[27] Delerive P, Martin-Nizard F, Chinetti G, Trottein F, Fruchart JC, Najib J, Duriez P, Steals B: Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway. Circ Res 85: 394–402 (1999)

[28] DiCicco R, Freed M, Allen A: A study of the effect of age on the pharmacokinetics of BRL49653C in healty volonteers. J Clin Pharmacol 35: 926 (1995)

[29] DeDios ST, Bruemmer D, Dilley RJ, Ivey ME, Jennings GL, Law RE, Little PJ: Inhibitory activity of clinical thiazolidindinedione peroxisome proliferator activating receptor-gamma ligands toward internal mammary artery, radial artery, and saphenous vein smooth muscle cell proliferation. Circulation 107: 2548–2550 (2003)

[30] Ehrmann DA, Schneider DJ, Sobel BE, Cavaghan MK, Imperial J, Rosenfield RL, Polonsky KS:. Troglitazone improves defects in insulin action, insulin secretion, ovarian steridogenesis, and fibrinolysis in women with polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab 82: 2108–2116 (1997)

[31] Fajas L, Aubœuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Steals B, Vidal H, Auwerx J: The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. J Biol Chem 272: 18779–18789 (1997)

[32] Fajas L, Fruchart JC, Ãuwerx J: Transcriptional control of adipogenesis. Curr Opin Cell Biol 10: 165–173 (1998)

[33] Fonesca V, Binswas N, Salzman A: Rosiglitazone in combination with metformin effectively reduces hyperglycaemia in patients with type II diabetes. Diabetes 49: 864 (1999)

[34] Fu MX, Wells-Knecht KJ, Blackledge J: Glycation, glycoxydation and crosslinking of collagen by glucose. Kinetics, mechanisms and inhibition of late stages of the Maillard reaction. Diabetes 43: 676–683 (1994)

[35] Fuell DJ, Freed MI, Greenberg AS, Haffner S, Chen J: The effect of treatment

with rosiglitazone on C-reactive protein and interleukin-6 in patients with type 2 diabetes [abstract no. 1813-PO]. Diabetes 50 suppl. 2: A435 (2001)

[36] Fulgencio JP, Kohl C, Girard J, Pegorier JP: Troglitazone inhibits fatty acid oxidation and esterification, and gluconeogenesis in isolated hepatocytes from starved rats. Diabetes 45: 1556–1562 (1996)

[37] Gerich J, Dostou J, Islam N: Mechanisms by which rosiglitazone improves glycaemic control in type 2 diabetes [abstract no. 771]. Diabetologia 44 suppl.1: 201 (2001)

[38] Gerstein HC, Yusuf S, Bosch J, Pogue J, Sheridan P, Dinccag N, Hanefeld M, Hoogwerf B, Laakso M, Mohan V, Shaw J, Zinman B, Holman RR: Effect of rosiglitazone on the frequency of diabetes in patients with impaired glucose tolerance or impaired fasting glucose: a randomised controlled trial. Lancet 368: 1096—105 (2006)

[39] Gimbrone MA: Endothelial dysfunction and the pathogenesis of atherosclerosis. In: F. N. Fidge, P. J. Nestel (eds). Atherosclerosis VII, Proceedings of th 7th Int. Symp. on Atherosclerosis. Amsterdam, Excerpta Medica 367–369 (1986)

[40] Glass CK, Witztum JL: Atherosclerosis, the road ahead. Cell 104: 503–516 (2001)

[41] Goetze S, Xi XP, Kawano H, Gotlibowski T, Fleck E, Hsueh WA, Law RE: PPARgamma-ligants inhibit migration mediated by multiple chemoatractans in vascular smooth muscle cells. J Cardiovasc Pharmacol 33: 798–806 (1999)

[42] Haffner SM, Greenberg AS, Weston MW, Chen H, Williams K, Freed MI: Effect of rosiglitazone treatment on nontraditional markers of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus. Circulation 106: 679–684 (2002)

[43] Hammes HP, Brownlee M, Edelstein D, Saleck M, Martin S, Federlin K: Aminoguanidine inhibits the developement of accelerated diabetic retinopathy in the spontaneous hypertensive rat. Diabetologia 37: 32–35 (1995)

[44] Hanefeld M, Brunetti P, Schernthaner GH, Matthews DR: One-year glycemic control with a sulfonylurea plus pioglitazone versus a sulfonylurea plus metformin in patients with type 2 diabetes. Diabetes Care 27: 141–147 (2004)

[45] Hansson GK: Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. N Engl J Med 352: 1685–1695 (2005)

[46] Hernandez-Pampaloni M, Quinones M, Bulnes-Enriquez I: Insulin-sensitizing thiazolidinediones improves coronary endothelial dysfunktion in insulin resistance by PET measurements of myocardial blood flow [abstract]. J AM Coll Cardio 39 suppl. A: 855FO–856 (2002)

[47] Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, Avila C, Kambham N, Bierhaus A, Nawroth PP, Neurath MF, Slaltery T, Bach D, Mc Clary J, Nagashima M, Moser J, Stern D, Schmidt AM. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. Cell 97: 889–901 (1999)

[48] Hori O, Brett J, Slattery T: The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphoterine. J Biol Chem 270: 25752–25761 (1995)

[49] Hotamisligil GS, Spiegelman BM: Tumor necrosis factor a: a key component of the obesity-diabetes link. Diabetes 43: 1271–1278 (1994)

[50] Hou M, Xia M, Zhu H, Wang Q, Li Y, Xiao Y, Zhao T, Tang Z, Ma J, Ling W: Lysophosphatidylcholine promotes cholesterol efflux from mouse macropha-

ge foam cells via PPARgamma-LXRalpha-ABCA1-dependent pathway associated with apoE. Cell Biochem Funct 25: 33–44 (2007)

[51] Hsueh WA, Law RE: PPARgamma and atheroVasc Biol 21: 1891–1895 (2001)

[52] Iglarz M, Touyz RM, Amiri F, Lavoie MF, Diep QN, Schiffrin EL: Effect of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and -gamma activators on vascular remodeling in endothelin-dependent hypertension. Arterioscler Thromb Vasc Biol 23: 45–51 (2003)

[53] Imamoto E, Yoshida N, Uchiyama K, Kuroda M, Kokura S, Ichikawa H, Naito Y, Tanigawa T, Yoshikawa T: Inhibitory effext of pioglitazone on expression of adhesion molecules on neutrophils and endothelial cells. Biofactors 20: 37–47 (2004)

[54] Ishibashi M, Egashira K, Hiasa K, Inoue S, Ni W, Zhao Q, Usui M, Kitamoto S, Ichiki T, Takeshita A: Antiinflammatory and antiatheriosclerotic effects of pioglitatzone. Hypertension 40: 687–693 (2002)

[55] Jiang C, Ting AT, Seed B: PPARgamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. Nature 391: 82–86 (1998)

[56] Jones NP, Charbonnel B, Lönnquist F, Õwen S, Patwardham R: Rosiglitazone reduces plasma insulin & its precursors while decreasing glycaemia in type II diabetics. Diabetes 49 suppl. 1: 859 (1999)

[57] Juhan-Vague I, Alessi MC: Plasminogen activator inhibitor 1 and atherothrombosis. Thromb Haemost 70: 138–143 (1993)

[58] Kintscher U, Goetz S, Wakino S, Kim S, Nagpal S, Chandraratna RA, 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)

[59] Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM: A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentation. Cell 83: 813–819 (1995)

[60] Koenig W: Haemostatic risk factors for cardiovascular diseases. Eur Heart J 19 suppl. C: C39–C43 (1998)

[61] Koshiyama H, Shimono D, Kuwamura N, Miniamikawa J, Nakamura Y: Rapid communication: inhibitory effect of pioglitazone on carotid arterial wall thickness in tpe 2 diabetes. J Clin Endocrinol Metab 86: 3452–3456 (2001)

[62] Lander HM, Tauras JM, Ogiste JS, Hori O, Moss RA, Schmidt AM: Activation of the Receptor for Advanced Glycation End Products Triggers a $p21^{ras}$-dependent Mitogen-activated Protein Kinase Pathway Regulated by Oxidant Stress. J Biol Chem 272, I: 17810–17814 (1997)

[63] Langenfeld MR, Forst T, Hohberg C, Kann P, Luebben G, Konrad T, Fuellert S, Sachara S, Pfueztner A: Pioglitazone decreases carotid intima-media thickness independent of glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. Circulation, suppl.: 7977 (2004)

[64] Law RE, Goetze S, Xi XP, Jackson S, Kawano Y, Demer L, Fishbein MC, Meehan WP, Hsueh WA: Expression and function of PPARγ in rat and human vascular smooth muscles cells. Circulation 101: 1311–1318 (2000)

[65] Law RE, Meehan WP, Xi XP, Graf K, Wuthrich DA, Coats W, Faxon D, Hsueh WA: Troglitazone inhibits vascular smooth muscle cell growth and intimal hyperplasia. J Clin Invest 98: 1897–1905 (1996)

[66] Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkinson WO, Willson TM, Kliewer SA: An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma). J Biol Chem 270: 12953–12956 (1995).

[67] Li AC, Brown KK, Silvestre MJ, Willson TM, Palinski W, Glass CK: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit developement of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. J Clin Invest 106: 502–531 (2000)

[68] Li J, Schmidt AM: Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. J Biol Chem 272: 16498–16506 (1997)

[69] Libby P: Molecular bases of the acute coronary syndromes. Circulation 91: 2844–2850 (1995)

[70] Makita Z, Bucala R, Rayfield EJ, Friedman EA, Kaufman AM, Korbet SM, Barth RH, Winston JA, Fuh H, Manogue KR: Reactive glycosylation endproducts in diabetic uraemia and treatment of renal failure. Lancet 343: 1519–1522 (1994)

[71] Martin-Nizard F, Furman C, Delerive P, Kandoussi A, Furchart JC, Duriez P: Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit oxidized low-density lipoprotein-induced endothelin-1 secretion in endothelial cells. J Cardiovasc Pharmacol 40: 822–831 (2003)

[72] Marx N: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and atherosclerosis. Curr Hypertens Rep 4: 71–77 (2002)

[73] Marx N, Walcher D: Vascular effects of PPARgamma activators — From bench to bedside. Prog Lipid Res 2007; 46: 283–296 (2007)

[74] Marx N, Bourcier T, Sukhova GK, Libby P, Plutzky J: PPARgamma activation in human endothelial cells increases plasminogen activator inhibitor type-1 expression: PPARgamma as a potential mediator in vascular disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol 19: 546–551 (1999)

[75] Marx N, Froehlich J, Siam L, Ittner J, Wierse G, Schmidt A, Scharnagl H, Hombach V, Koenig: Antidiabetic PPAR-gamma activator rosiglitazone reduces MMP-9 serum levels in type 2 diabetic patients with coronaryartery disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol J 23: 283–288 (2003)

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

[77] Marx N, Kehrle B, Kohlhammer K, Grub M, Koenig W, Hombach V, Libby P, Plutzky J: PPAR activators as inflammatory mediators in human T lymphocytes: implications for atherosklerosis and transplantation-associated artheriosclerosis. Circ Res 90: 703–710 (2002)

[78] Marx N, Mach F, Sauty A, Leung JH, Sarafi MN, Ransohoft RM, Libby P, Plutzky J, Luster AD: PPARγ activators inhibit IFN-gamma-induced expression of the T-cell-active CXC chemokines IP-10, Mig and I-TAC in human endtohelial cells. J Immunol 164: 6503–6508 (2000)

[79] Marx N, Mackmann N, Schönbeck U, Yilmaz N, Hombach V, Libby P, Plutzky J: PPARalpha activators inhibit tissue Factor expression and activity in human monocytes. Circulation 103: 213–219 (2001)

[80] Marx N, Schönbeck U, Lazar MA, Libby P, Plutzky J: Peroxisome proliferator activated receptor gamma activators inhibit gene expression and migration in human vascular smooth muscle cells. Circ Res 83: 1097–1103 (1998)

[81] Marx N, Sukhova G, Collins T, Libby P, Plutzky J: PPARα activatores inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule 1 expression in human endothelial cells. Circulation 99: 3125–3131 (1999)

[82] Marx N, Sukhova G, Murphy C, Libby P, Plutzky J: Macrophages in human atheroma contain PPARgamma: differentiation-dependant peroxisomal proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) expression and reduction of MMP-9 activity through PPARgamma activation in mononuclear phagocytes in vitro. Am J Pathol 153: 17–23 (1998)

[83] Marx N, Walcher D, Ivanova N, Rautzenberg K, Jung A, Reinhard F, Hombach V, de Caterina R, Basta G, Wautier MP, Wautiers JL: Thiazolidinediones Reduce Endothelial Expression of Receptors for Advanced Glycation End Products. Diabetes 53: 2662–2668 (2004)

[84] Marx N, Woehrle J, Nusser T, Walcher D, Rinker A, Hombach V, Koenig W, Höher M: Pioglitazone treatment reduces neointimal proliferation after coronary stentimplantation in non-diabetic conronary artery disease patients — results of a randomized, placebo-controlled double-blind trial. ACC 2005 presented at the late breaking clinical trial session.

[85] Matthews DR, Bakst A, Weston WM, Hemyrari P: Rosiglitazone decreases insulin resistance and improves beta-cell function in patients with type II diabetes. Diabetes 49 suppl. 1: 858 (1999)

[86] Miyazaki Y, Glass L, Triplitt C, Matsuda M, Cusi K, Mahankali A, Mahankali S, Mandarino LJ, de Fronzo RA: Effect of rosiglitazone on glucose and non-esterified fatty acid metabolism in type II diabetic patients. Diabetologia 2001 Dec; 44:2210-9; Gerich J, Dostou J, Islam N, et al. Mechanisms by which ro-

siglitazone improves glycaemic control in type 2 diabetes [abstract no.771]. Diabetologia 44 suppl. 1: 201 (2001)

[87] Miyazaki T, Niwa T, Morit T, Koda Y, Yuasa Y, Sakai S, Suzuki M, Takahashi S, Hirasawa Y: Advanced glycation end products are associated with beta-2-microglobulin amyloidosis. Am J Nephr: 15 (1995)

[88] Muench G, Thome J, Foley P, Schinzel Y, Riederer P: Advanced glycation end-products in aging and Alzheimer's disease. Brain Res Rev 23: 134–143 (1997)

[89] Murakami T, Mizuno S, Ohsato K, Moriuchi I, Arai Y, Nio Y, Kaku B, Takahash Y, Ohnaka M: Effects of troglitazone on frequency of coronary vasospastic-induced angina pectoris in patients with diabetes mellitus. Am J Cardiol 84: 92–94 (1999)

[90] Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM: Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. Cell 93: 229–240 (1998)

[91] Nakamura T, Matsuda T, Kawagoe Y, Ogawa H, Takahashi Y, Sekizuka K, Koide H: Effect of Pioglitazone on Carotid Intima-Media Thickness and Arterial Stiffness in Type 2 Diabetic Nephropathy Patients. Metabolism 53: 1382–1386 (2004)

[92] Nakamura T, Ushiyama C, Osada S, Hara M, Shimada M, Koide H: Pioglitazone reduces urinary podocyte excretion in type 2 diabetes patients with microalbuminuria. Metabolism 50: 1193–1196 (2001)

[93] Natali A, Baldeweg S, Toschi E, Capaldo B, Barbaro D, Gastaldelli A, Yudkin JS, Ferranini E: Vascular Effects of Improving Metabolic Control With Metformin or Rosiglitazone in Type 2 Diabetes. Diabetes Care 27: 1349–1357 (2004)

[94] Nawroth PP, Bierhaus A, Vogel GE, Hofmann MA, Zumbach M, Wahl P, Ziegler R: Non-enzymatic glycation and oxidative stress in chronic illnesses and diabetes mellitus. J Med Klin 94: 29–38 (1999)

[95] Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, Elliston K, Stern D, Shaw A: Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. J Biol Chem 267: 14998–15004 (1992)

[96] Nesto R: C-reactive protein, its role in inflammation, Type 2 diabetes and cardiovascular disease and the effects of insulin-sensitizing tratment with thiazolidinediones. Diabet Med 21: 810–817 (2004)

[97] Njorge FG, Monnier VM: The chemestry of the maillard reaction under physiological conditions: a review. Prog Clin Biol Res 304: 85–107 (1989)

[98] Oakes ND, Camilleri S, Furler SM, Chisholm DJ, Kraegen EW: The insulin sensitizer, BRL49653, reduces systemic fatty acid supply and utilization and tissue lipid availability in the rat. Metabolism 46: 935–942 (1997)

[99] Ovalle F, Bell D: Differing effects of thiazolidinediones on LDL subfractions LP(a) [abstract no.1896-PO] and [abstract no. 1930-PO]. Diabetes 50 suppl. 2: 453–454, 1: A461–A462 (2001)

[100] Owen S, Charbonell B, Lönnquist F, Patwardham R: Rosiglitazone is an effective alternative to glibenclamide as first-line therapy in type II diabetics. Diabetes 49 suppl. 1: 868 (1999)

[101] Oxlund H, Andreassen TT: Aminoguanidine treatment reduces the increase in collagen stability or rats with experimental diabetes mellitus. Diabetolgia 35: 37–38 (1992)

[102] Pantel J, Weston W, Hemyari P: Rosiglitazone decreases insulin resistance and improves beta-cell function in patients with type 2 diabetes mellitus [abstract no. P3-153]. The Endocrine Society's 81st Annual Meeting Programs and Abstracts: 470 (1999)

[103] Parhofer K: Diabetische Dyslipoproteinämie Kardiovaskuläres Risiko und Therapie. Cardiovasc: 28–32 (2001)

[104] Park L, Raman KG, Lee KJ, Lu Y, Ferran LJ, Chow WS, Stern D, Schmidt AM: Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. Nat Med 4: 1025–1031 (1998)

[105] Peuter JD, Phare SM, Iannucci AR, Hodorek MJ: Differential inhibitory effects of antidiabetic drugs on arterial smooth muscle cell proliferation. Am J Hypertens 9: 188–192 (1996)

[106] Pistrosch F, Passauer J, Fischer S, Fuecker K, Hanefeld M, Gross P: In Type 2 Diabetes, Rosiglitazone Therapy for Insulin Resistance Ameliorates Endothlial Dysfunction Independent of Glucose Control. Diabetes Care 27: 484–490 (2004)

[107] Ray DM, Akbiyik F, Phipps RP: The peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) ligands 15-deoxy- Delta12,14-prostaglandin J2 and ciglitazone induce human B lymphocyte and B cell lymphoma apoptosis by PPARgammaindependent mechanisms. J Immunol 177: 5068–5076 (2006)

[108] Ray DM, Spinelli SL, O'Brien JJ, Blumberg N, Phipps RP: Platelets as a novel target for PPARgamma ligands: implications for inflammation, diabetes, and cardiovascular disease. BioDrugs 20: 231–241 (2006)

[109] Ricote M, Huang J, Fajas L, Li A, Welch J, Najib J, Witztum JL, Auwerx J, Palinski W, Glass CK: Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor

gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. Proc Natl Acad Sci USA 95: 7614–7619 (1998)

[110] Ritthaler U, Deng Y, Zhang Y, Greten J, Abel M, Sido B, Allenberg J, Otto G, Roth H, Bierhaus A: Expression of receptors for advanced glycation end products in peripheral occlusive vascular disease. Am J Pathol 146: 688–694 (1995)

[111] Ross R: Atherosclerosis — an inflammatory disease. N Engl J Med 340: 115–126 (1999)

[112] Satoh H, Tsukamoto K, Hashimoto Y, Hashimoto N, Togo M, Hara M, Maekawa H, Isoo N, Kimura S, Watanabe T: Thiazolidinediones suppress endothelin-1 secretion from bovine vascular endothelial cells: a new possible role of PPARgamma on vascular endothelial function. Biochem Biophys Res Commun 254: 757–763 (1999)

[113] Satoh N, Ogawa Y, Usui T, Tagami T, Kono S, Uesugi H, Sugiyama H, Sugawara A, Yamada K, Shimatsu A, Kuzuya, Nakao K: Antiatherogenic effect of pioglitazone in type 2 diabetic patients irrespective of the responsivness to its antidabetic effect. Diabetes Care 26: 2493–2499 (2003)

[114] Schmidt AM, Hori O, Brett J, Yan SD, Wautier JL, Stern D: Cellular receptors for advanced glycation end products. Implications for inducations for induction of oxidant stress and cellular dysfunktion in the pathogenesis of vascular lesions. Arterioscler Thromb 14: 1521–1528 (1994)

[115] Schmidt AM, Stern D: Atherosclerosis and diabetes: The RAGE connection. Current Atherosclerosis Reports 2: 430–436 (2000)

[116] Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M, Brett J, Ryan J, Kao J, Esposito C, Hegarty H, Hurley W, Clauss M: Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. J Biol Chem 267: 14987–14997 (1992)

[117] Schmidt AM, Yan SD, Stern DM: The dark side of glucose. Nature Med 1: 1002–1004 (1995)

[118] Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern D: Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. Circ Res 84: 489–497 (1999)

[119] Schmidt S, Moric E, Schmidt M, Gastre M, Feinstein DL, Heneka MT: Antiinflammatory and antiproliferative actions of PPAR-gammaagonists on T-lymphocytes derived form MS patients. J Leukoc Biol 75: 478–485 (2004)

[120] Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B, Auwerx J: PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. Embo J 15: 5336–5348 (1996)

[121] Schoonjans K, Steals B, Auwerx J: The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentation. Biochim Biophys Acta 1996a 1302: 93–109 (1996)

[122] Schoonjans K, Steals B, Auwerx J: Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. J Lipid Res 1996b 37: 907–925 (1996)

[123] 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 gamma modulators with angiotensin receptor blocking activity. Diabetes 54: 3442-–52 (2005)

[124] Sidhu JS, Cowan D, Kaski JC: The Effects of Rosigiltazone, a Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Agonist, on Markers of Endothelial Cell Activation, C-Reactive Protein, and Fibrinogen Levels in Non-Diabetic Coronary Artery Disease Patients. Am Coll Cardiol 42: 1757–1763 (2003)

[125] Sidhu JS, Kaposzta Z, Markus HS, Kaski JC: Effect of Rosiglitazone on Common Carotid Intima-Media Thickness Progression in Coronary Artery Disease Patients Without Diabetes. Arterioscler Thromb Vasc Biol 24: 1–5 (2004)

[126] Simionescu N, Simionescu M: Endothelial cell dysfunction. New York, Plenum Press (1992)

[127] Smith SA, Moore G, Charlton S: Rosiglitazone influences macrophage function but not monocyte/macrophage differentiation [abstract no. 1156]. Diabetes 48 suppl. 1: 264 (1999)

[128] SmithKline Beecham Pharmaceuticals: Rosiglitazone maleate tables prescribing information. Philadelphia, PA, USA (2001)

[129] Spiegelman BM: PPARgamma: Adipogenesis regulator and thiazoledinedione receptor. Diabetes, 507–514 (1998)

[130] Staels B, Koenig W, Habib A, Merval R, Lebret M, Torra IP, Delerive P, Fadel A, Chinetti G, Fruchart JC, Najib J, Maclouf J, Tedgui A: Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. Nature 393: 790–793 (1998)

[131] Suzuki M, Takamisawa I, Suzuki K: Close association between insulin resi-

stance and vascular endothelial dysfunction in subjects with type 2 diabetes and improvement by pioglitazone [abstract]. Diabetes 51 suppl. 2: A304 (2002)

[132] Takagi T, Yamamuro A, Tamita K, Yambe K, Katayama M, Mizoguchi S, Ibuki M, Tani T, Tanabe K, Nagai K, Shiraton K, Morioka S, Yoshikawa J: Pioglitazone reduces neointima/tissue proliferation agter coronary stent implantation in patients with type 2 diabetes mellitus: an intravascular unltrasound scanning study. Am Heart J 146: E5 (2003)

[133] Tanaka N, Yonekura H, Yamagishi S, Fujimori H, Yamamoto Y, Yamamoto H: The receptor for advanced glycation end products is induced by the glycation pdoducts themselves and tumor necrosis factor-alpha through nuclear factor-kappa B, and by 17beta-estradiol through Sp-1 in human vascular endothelial cells. J Biol Chem 275: 25781–25790 (2000)

[134] Thomas JC, Taylor KB: Effects of thiazolidinediones on lipoprotein subclasses in patients who are insulin resistant [abstract no. 1902-PO]. Diabetes 50 suppl.2: A455 (2001)

[135] Thompson KA, Miller AK, Inglis AML, Patterson S, Jorkasky D, Freed MI: Rosiglitazone does not markedly alter CYP3A4-mediated drug metabolism. Diabetes 48 suppl. 1: 852 (1999)

[136] Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM: Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. Cell 79: 1147–1156 (1994)

[137] Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM: PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentation and uptake of oxidized LDL. Cell 93: 241–252 (1998)

[138] Vlassara H, Brownlee M, Ceramini A: High affinity receptor mediated uptake and degradation of glucose modified proteins: a potntial mechanism for the removal os senscent macromolecules. Proc Natl Acad Sci USA 82: 5588–5592 (1985)

[139] Vlassara H, Bucala R, Striker L: Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochmeical and clinical implications for diabetes and aging. Lab Invest 70: 138-135 (1994)

[140] Watkins PB, Whitcomb RW: Hepatic dysfunction associated with troglitazone. N Engl J Med 26: 916–917 (1998)

[141] Wautier JL, Zoukourian C, Chappey O, Wautier M, Guillausseau P, Cao R, Hori O, Stern D, Schmidt AM: Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy. Soluble receptor for advanced glycation end peoducts blocks hyperpermeability in diabetic rats. J Clin Invest 97: 238–243 (1996)

[142] Weston WM, Freed MI, Heise M: Rosiglitazone produces longterm reductions in urinary albumin excretion in typ 2 diabetes [abstract no. P197]. Diabet Med 17 suppl. 1: 87 (2000)

[143] Whitcomb RW, Saltiel AR: Thiazolidinediones. Expert Opin Invest Drugs 4(12): 1299–1309 (1995)

[144] Wisotzky J, Sommer M, Schubert K: Die Akkumulation von AGEs im Alterungsprozeß, bei Diabetes mellitus und bei der chronischen Niereninsuffizienz. Med Klin 91: 454–457 (1996)

[145] Yan SD, Chen X, Fu J: RAGE and amyloid-b-peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. Nature 382: 685–691 (1996)

[146] Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D, Stern D: Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. J Biol chem 269: 9889–9897 (1994)

[147] Yan SD, Yan SF, Chen X, Fu J, Chen M, Kuppusamy P, Smith MA, Perry G, Godman GC, Nawroth P: Non-enzymatically glycated tau in Alzheimer's disease induces neuronal oxidant stress resulting in cytokine gene expression and release of amyloid b-peptide. Nat Med: 693–699 (1995)

[148] Young PW, Buckle DR, Cantello BCC, Chapman H, Clapham JC, Coyle PJ, Haigh D, Hindley RM, Holder JC, Kallender H, Latter AJ, Lawrie KWM, Mossakowska D, Murphy GJ, Cox LR, St. Smith A: Identification of high-affinity binding sites for the insulin sensitizer rosiglitazone (BRL-49653) in rodent and human adipocytes using a radioiodinated ligand for peroxisomal proliferators γ activated receptor. J Pharmacol Exp Ther 284: 751–759 (1998).

[149] Young PW, Cawthorne MA, Coyle PJ: Repeat treatment of obese mice with BRL49653, a new and potent insulin sensitizer, enhances insulin action in white adipocytes: association with increased insulin binding and cell-surface GLUT4 as measured by photoaffinity labeling. Diabetes 44: 1087–1092 (1995)

[150] Zahradka P, Wright B, Fuerst M, Yurkova N, Molnar K, Taylor CG: Peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma ligands differentially affect smooth muscle cell proliferation and migration. J Pharmacol Exp Ther 317: 651–659 (2006)

Abbildungsverzeichnis

1 Peroxisome proliferator-activated receptors 9

2 Glitazone hemmen die endotheliale RAGE-Expression. 28

3 Glitazone vermindern die basale RAGE-Gesamtproteinmenge 30

4 Thiazolidindione vermindern die TNF-α induzierte Gesamtproteinmenge an RAGE 31

5 Rosiglitazon vermindert die TNF-α induzierte Gesamtproteinmenge an RAGE 32

6 Pioglitatzone vermindert die TNF-α induzierte Gesamtproteinmenge an RAGE dosisabhängig 33

Danksagung

Ich danke allen, die mir bei der Durchführung dieser Arbeit behilflich waren, insbesondere Prof. Dr. N. Marx, Dr. D. Walcher, Miriam Grüb und Helga Bach. Stellvertretend für die Familie und Freunde, die mich in der Zeit der Erstellung der Dissertation unterstützt haben, möchte ich mich vor allem bei Goerel Rautzenberg, Peter Lorch, Christiane Menz und Tim Weyrich bedanken.

Lebenslauf

Name:	Kirstin Rautzenberg
geboren am:	06.07.1976 in Böblingen
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Eltern:	Werner Rautzenberg (Kunstweber)
	Ursula Rautzenberg (geb. Thomas; Hebamme)
Schulische Ausbildung:	Freie Waldorfschule Pforzheim, 08/1982–07/1989
	Reuchlin-Gymnasium Pforzheim, 08/1989–06/1997
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Studium der Humanmedizin:	an der Universität Ulm, WS 1997–SS 2003
	Ärztliche Vorprüfung 06.09.1999
	1. Staatsexamen 22.03.2001
	2. Staatsexamen 02.09.2002
	3. Staatsexamen 16.10.2003
weitere Ausbildungen:	Ausbilderin in der Ersten-Hilfe 1997
	Ausbildung zur Schwesternhelferin 1998
Praktisches Jahr:	Chirurgie: Universitätsklinik Pretoria, Südafrika, 09.10.2002–08.02.2003

	Anästhesie: Universitätsspital Zürich, Schweiz, 09.02.2003–31.05.2003
	Innere Medizin: Kreiskrankenhaus, Biberach, 02.06.2003–30.09.2003
Arzt im Praktikum:	Innere Medizin: Kreiskrankenhaus Rheinfelden, 01.12.03–28.02.04
	Neurologie: Hegau-Klinikum GmbH Singen, 01.04.04–30.09.04
Assistenzarzt:	Neurologie: Hegau-Klinikum GmbH Singen, 01.10.04–31.03.2006
	Neurologie: Schmieder Kliniken Allensbach, 01.04.04–31.03.2008
	Psychosomatik: Schmieder Kliniken Konstanz, seit 01.04.2008