

Aus der
Universitätsklinik für Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. V. Hombach

**Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ -aktivierende
Glitazone vermindern die Ansprechbarkeit humaner
Endothelzellen auf proinflammatorische Advanced Glycation
Endproducts -Effekte**

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

vorgelegt von
Annelie Susanne Jung

Pforzheim

2004

Amtierender Dekan:

Berichterstatter:

Berichterstatter:

Tag der Promotion:

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden im Rahmen der 68. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie- Herz- und Kreislaufforschung im April 2002 in Mannheim als Poster mit folgendem Titel veröffentlicht:

PPAR γ -aktivierende Glitazone hemmen die Expression der receptors for advanced glycation endproducts (RAGEs) in humanen Endothelzellen – PPAR γ -Aktivierung als neuer Mechanismus zur Modulation der Atherogenese bei Diabetikern?

N. Marx, K. Rautzenberg, A. Jung, M. Grüb, H. Bach, V. Hombach (Innere Medizin II – Kardiologie, Universität Ulm).

Publikation in Vorbereitung:

Marx N, Walcher D, Ivanova N, Rautzenberg K, Jung A, Friedl R, Hombach V, de Caterina R, Basta G, Wautier MP, Wautier JL: PPAR α -activating thiazolidinediones reduce endothelial expression of receptors for advanced glycation endproducts (RAGEs)

1 INHALTSVERZEICHNIS

1	Inhaltsverzeichnis	1
2	Abbildungsverzeichnis	3
3	Tabellenverzeichnis	3
4	Abkürzungsverzeichnis	4
5	Einleitung	7
5.1	Diabetes mellitus als Risikofaktor für Arteriosklerose.....	7
5.2	Die Pathogenese der Arteriosklerose.....	7
5.2.1	Die Rolle des Chemokins MCP-1 bei der Arterioskleroseentstehung	9
5.2.2	Die Rolle des Adhäsionsmoleküls VCAM-1 bei der Arterioskleroseentstehung	10
5.3	Die Bedeutung von AGEs/ RAGEs bei der Atherogenese.....	11
5.4	Die nukleären Transkriptionsfaktoren: Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs).....	14
5.5	Fragestellung	16
6	Material und Geräte.....	17
6.1	Chemikalien.....	17
6.2	Radioaktive Reagenzien	18
6.3	Antikörper.....	18
6.4	Oligonukleotide	18
6.5	Molekularbiologische Kits	19
6.6	Puffer und Lösungen	19
6.7	Zellkulturmaterial	22
6.8	Verbrauchsmaterial.....	22
6.9	EDV	23
6.10	Geräte	23

7	Methoden	24
7.1	Zellbiologische Methoden.....	24
7.1.1	Isolation und Kultivierung von Endothelzellen.....	24
7.1.2	Fluoreszenzmethoden zur Überprüfung der Zellreinheit.....	24
7.2	Stimulation der Zellen.....	25
7.3	Gelshiftanalyse/Electro Mobility Shift Assay (EMSA).....	26
7.3.1	Isolierung von nukleären Extrakten.....	26
7.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	27
7.3.3	Radioaktive Markierung der DNA-Sonde.....	27
7.3.4	Herstellung eines 5%-igen, nicht-denaturierenden Polyacrylamidgels.....	28
7.3.5	Polyacrylamidgel-Elektrophorese.....	28
7.4	Northern Blot.....	29
7.4.1	RNA-Isolierung.....	29
7.4.2	Agarosegel-Elektrophorese.....	29
7.4.3	Blotting/Transfer der RNA auf eine Nylonmembran.....	30
7.4.4	Hybridisierung von Northern Blots mit spezifischen DNA-Sonden.....	31
7.5	ELISA.....	31
7.6	Statistik.....	33
8	Ergebnisse	34
8.1	PPAR γ -Aktivatoren reduzieren die AGE- und β -Amyloid-induzierte MCP-1-Proteinexpression in Endothelzellen.....	34
8.2	PPAR γ -Aktivatoren reduzieren die β -Amyloid-induzierte MCP-1 mRNA-Expression in Endothelzellen.....	36
8.3	PPAR γ -Aktivatoren reduzieren die β -Amyloid-induzierte VCAM-1-mRNA-Expression in humanen Endothelzellen.....	37
8.4	PPAR γ -Aktivatoren reduzieren die β -Amyloid-induzierte NF κ B-Aktivierung in Endothelzellen.....	38
9	Diskussion	40
10	Zusammenfassung	48
11	Literaturverzeichnis	50
12	Danksagung	59
13	Lebenslauf	60

2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<u>Abbildung 1</u> : Histologischer Schnitt einer frühen arteriosklerotischen Läsion	8
<u>Abbildung 2</u> : Schematische Darstellung der AGE-Entstehung.....	12
<u>Abbildung 3</u> : Schematische Darstellung des Ablaufs eines ELISAs.....	32
<u>Abbildung 4</u> : PPAR γ -vermittelte Effekte auf die AGE-induzierte MCP-1 Expression im ELISA.....	35
<u>Abbildung 5</u> : PPAR γ - vermittelte Effekte auf die β -Amyloid-induzierte MCP-1-Expression im ELISA.....	35
<u>Abbildung 6</u> : PPAR γ -vermittelte Effekte auf die TNF α -induzierte MCP-1-Expression im ELISA.....	36
<u>Abbildung 7</u> : Northern Blot mit einer MCP-1-Sonde	37
<u>Abbildung 8</u> : Northern Blot mit einer VCAM-1-Sonde	38
<u>Abbildung 9</u> : Gelshiftanalyse	39

3 TABELLENVERZEICHNIS

<u>Tabelle 1</u> : Schema der Stimulation der verwendeten humanen Endothelzellen.....	26
---	----

4 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABCA-1	<u>A</u> TP- <u>b</u> inding <u>c</u> assette-1
AGE	<u>a</u> dvanced <u>g</u> lycation <u>e</u> ndproduct
AP-1	<u>a</u> ctivating <u>p</u> rotein-1
APS	<u>A</u> mmonium <u>p</u> ersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
BCA	<u>B</u> icin <u>h</u> onic <u>A</u> cid
BSA	<u>B</u> ovines <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin
CD	<u>c</u> luster <u>d</u> etermant (Differenzierungsantigen, definiert durch Gruppen monoklonaler Antikörper)
cDNA	<u>c</u> omplementary (komplementäre) <u>D</u> NA
COX-2	<u>C</u> yclooxygenase-2
dATP	<u>d</u> esoxy- <u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat
dCTP	<u>d</u> esoxy- <u>C</u> ytosin <u>t</u> riphosphat
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
dGTP	<u>d</u> esoxy- <u>G</u> uanin <u>t</u> riphosphat
DNA	<u>D</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid (Desoxyribonukleinsäure)
DTT	<u>D</u> L- <u>D</u> ithio <u>t</u> hreitol
dTTP	<u>d</u> esoxy- <u>T</u> hymidin <u>t</u> riphosphat
EBM	<u>E</u> ndothelzell- <u>B</u> asal <u>m</u> edium
ECGS	<u>E</u> ndothelial <u>c</u> ell <u>g</u> rowth <u>s</u> upplement
EDTA	<u>E</u> thylendiamin <u>t</u> etraessigsäure
ELISA	<u>E</u> nzyme <u>l</u> inked <u>i</u> mmuno <u>s</u> orbent <u>a</u> ssay
EMSA	<u>E</u> lectro <u>m</u> obility <u>s</u> hift <u>a</u> ssay
FCS	<u>F</u> etal <u>c</u> alf <u>s</u> erum
GAPDH	<u>G</u> lyceral <u>a</u> ldehyde <u>p</u> hosphatase <u>d</u> e <u>h</u> ydrogenase
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HEPES	N-(2- <u>h</u> ydroxy <u>e</u> thyl)piperazine-N'-(2- <u>e</u> thanesulfonic acid)
HSVECs	<u>H</u> uman <u>s</u> aphenous <u>v</u> ein <u>e</u> ndothelial <u>c</u> ells
HUVECs	<u>H</u> uman <u>u</u> mbilical <u>v</u> ein <u>e</u> ndothelial <u>c</u> ells
ICAM-1	<u>I</u> nter <u>c</u> ellular <u>a</u> dhesion <u>m</u> olecule-1

IFN γ	<u>I</u> nter <u>f</u> er <u>o</u> n <u>g</u> amma
IL	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin
iNOS	<u>i</u> nducible <u>n</u> itric <u>o</u> xide <u>s</u> ynthetase
IP-10	<u>I</u> nterferon-inducible <u>p</u> rotein- of 10 kD
ITAC	<u>I</u> nterferon-inducible <u>T</u> -cell <u>a</u> lpha <u>c</u> hemoattractant
KCl	Kaliumchlorid
kD	<u>k</u> ilo <u>D</u> alton
LDL	<u>L</u> ow- <u>D</u> ensity <u>L</u> ipoproteins
M	Einheit der molekularen Masse ($1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)
MCP-1	<u>M</u> onocyte <u>c</u> hemoattractant <u>p</u> rotein-1
MCSF	<u>M</u> acrophage <u>c</u> olony <u>s</u> timulating <u>F</u> actor
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MIG	<u>M</u> onokine <u>i</u> nduced by Interferon <u>g</u> amma
MOPS	3- <u>M</u> orpholinopropane <u>s</u> ulfonic acid
mRNA	<u>m</u> essenger <u>R</u> NA (Boten-RNA)
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumnitrat
NF κ B	Nuclear factor kappa B
NO	Stickoxid
Nonidet [®] P40	Ethylphenyl-polyethyleneglycol (NP40) Nonionic detergent
PDGF	<u>P</u> latelet <u>d</u> erived <u>g</u> rowth <u>f</u> actor
P21ras	P21 <u>r</u> at <u>s</u> arcoma
PAI-1	Plasminogen <u>a</u> ctivator <u>i</u> nhibitor-1
PBS	<u>P</u> hosphat <u>b</u> uffered <u>s</u> aline
PECAM-1	<u>P</u> latelet <u>e</u> ndothelial <u>c</u> ell <u>a</u> dhesion <u>m</u> olecule 1
pH	<u>p</u> otentia <u>h</u> ydrogenii (Maßeinheit für die Konzentration von Wasserstoffionen)
PMSF	<u>P</u> henyl- <u>M</u> ethanesulfonyl <u>f</u> luoride
PolydIdC	<u>P</u> oly- <u>d</u> eoxy- <u>i</u> nsonic- <u>d</u> eoxycytidylic acid
PPAR	<u>P</u> eroxisome <u>p</u> roliferator <u>a</u> ctivated <u>r</u> eceptor
RAGE	<u>R</u> eceptor for <u>a</u> dvanced <u>g</u> lycation <u>e</u> ndproduct
RNA	<u>R</u> ibonucleic <u>a</u> cid (Ribonukleinsäure)
RPM	<u>R</u> ounds <u>p</u> er <u>m</u> inute (Umdrehungen pro Minute)
SDS	<u>S</u> odium <u>d</u> odecylsulfat

SMCs	<u>S</u> mooth <u>m</u> uscle <u>c</u> ells (glatte Gefäßmuskelzellen)
SSC	<u>S</u> odiumazetat- <u>S</u> odium <u>c</u> lorid
STAT-1	<u>S</u> ignal <u>t</u> ransducer and <u>a</u> ctivator of <u>t</u> ranscription-1
TBE	<u>T</u> ris- <u>B</u> orsäure- <u>E</u> DTA
TE	<u>T</u> ris- <u>E</u> DTA
TEMED	N,N,N',N'- <u>T</u> etramethylethylendi <u>a</u> min
T-Lymphozyt	<u>T</u> hymus-Lymphozyt
TNF α	<u>T</u> umornekrosefaktor α
Trizma Base	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween20	Polyoxyethylenesorbitan monolaurate
VEGF 1/2	<u>V</u> ascular <u>e</u> ndothelial growth <u>f</u> actor 1/2
VCAM-1	<u>V</u> ascular <u>c</u> ell <u>a</u> dhesion <u>m</u> olecule 1
VLA-4	<u>V</u> ery <u>l</u> ate <u>a</u> ntigen 4
WHO	<u>W</u> orld <u>H</u> ealth <u>O</u> rganisation (Welt-Gesundheitsorganisation)

5 EINLEITUNG

5.1 Diabetes mellitus als Risikofaktor für Arteriosklerose

Patienten, die an Diabetes mellitus erkrankt sind, haben ein zwei bis vierfach erhöhtes Risiko für die Entstehung arteriosklerotischer Gefäßwandveränderungen. Daraus resultiert ein erhöhtes Risiko für Folgekrankheiten, wie zum Beispiel akuten Myokardinfarkt, ischämischen Insult oder arterielle Verschlusskrankheit [4]. Ein Diabetiker trägt ein drei bis fünffach höheres Risiko an einer kardiovaskulären Erkrankung zu sterben als ein Nichtdiabetiker [77]. Schon heute führen die kardiovaskulären Erkrankungen die Liste der zu Tode führenden Krankheiten in den USA, Europa und Japan an. Da schätzungsweise weltweit bis zum Jahr 2025 die Anzahl Erwachsener Diabetiker auf 300 Millionen ansteigen wird [33], stellen die Prävention, Früherkennung und Therapie der Arteriosklerose in dieser Patientengruppe eine bedeutende Herausforderung für die Zukunft dar.

In den letzten Jahren konnte ein tieferer Einblick in die Ursachen für dieses erhöhte Risiko des Diabetikers gewonnen werden. Neben komplexen metabolischen Störungen, wie Hypercholesterinämie, Hypertriglyceridämie und Veränderungen des Gerinnungssystems [7] scheint ein erhöhtes Vorkommen von sogenannten nichtenzymatisch glykierten Endprodukten (advanced glycation endproducts, AGEs) die Arterioskleroseentstehung bei diesen Patienten zu fördern.

AGEs wirken über spezielle Zelloberflächenrezeptoren in der Gefäßwand direkt atherogen [69]. Eine Modifikation der Wirkung von AGEs auf vaskuläre Zellen könnte einen viel versprechenden Ansatz zur Beeinflussung der Arterioskleroseentstehung bei Diabetikern darstellen.

5.2 Die Pathogenese der Arteriosklerose

Die Arteriosklerose ist nach der WHO definiert als „variable Kombination von Intimaveränderungen, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia“ [63]. Experimentelle und klinische Studien der letzten Jahre konnten zeigen, dass bei der

Arteriosklerose ein chronischer Entzündungsprozess in der Gefäßwand von zentraler Bedeutung ist. Am Anfang der Entstehung arteriosklerotischer Läsionen steht die endotheliale Dysfunktion. Diese Störung der funktionellen Integrität des Gefäßendothels wird durch zahlreiche Faktoren wie freie Radikale, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, erhöhte Spiegel an LDL und Homocystein, infektiöse Mikroorganismen wie z.B. Humanes Herpesvirus und *Clamydia pneumoniae*, [64] hämodynamische Scherkräfte [16] und bestimmte Cytokine wie IL-1 und TNF α [60] hervorgerufen.

Diese Dysregulation wichtiger homöostatischer Mechanismen in Endothelzellen führt zu einer veränderten Vasoreaktivität und einer verminderten Konzentration des vasoprotektiven Moleküls Stickstoffmonoxid [42]. Eine zentrale Rolle spielt die gesteigerte Adhäsivität für mononukleäre Leukozyten, die durch AGEs, LDL und andere Stimuli der endothelialen Dysfunktion induziert wird. Sie drückt sich in einer erhöhten Expression endothelialer und leukozytärer Adhäsionsmoleküle wie den Selektinen, VCAM-1, ICAM-1 oder PECAM-1 aus. Sie führt zur Anheftung und, vermittelt von chemotaktischen Substanzen wie MCP-1, IL-8 oder MCSF zum Einwandern von T-Lymphozyten und Monozyten [64].

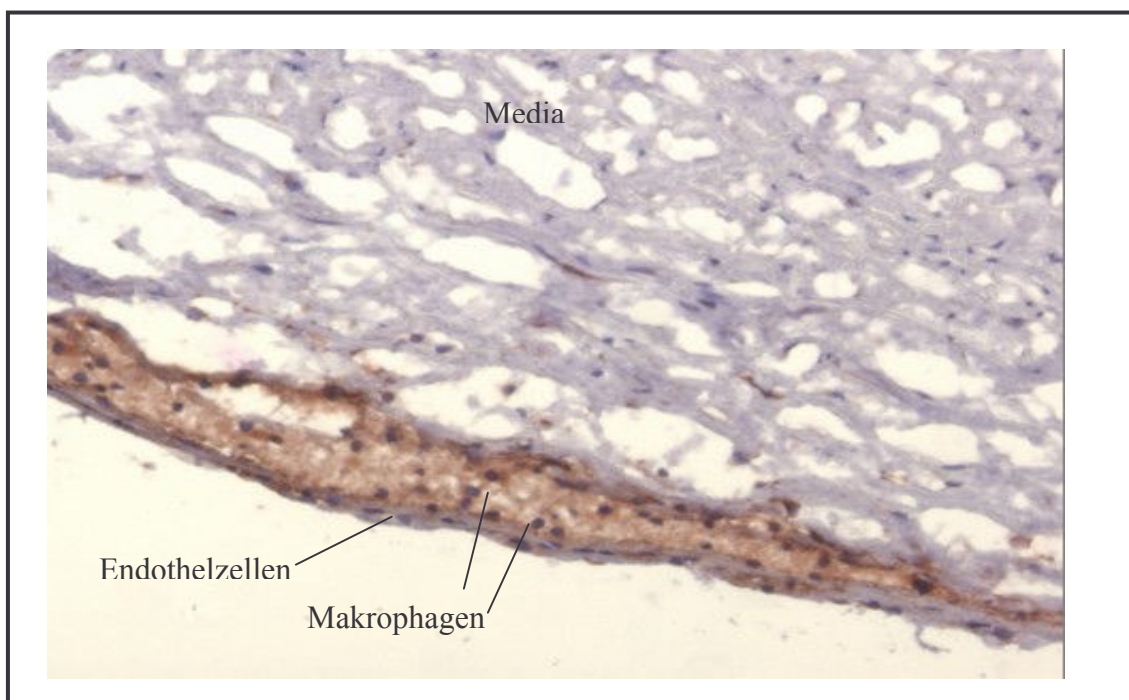


Abbildung 1: Histologischer Schnitt einer frühen arteriosklerotischen Läsion

Man erkennt neben subendothelialer Lipoproteinakkumulation eingewanderte Makrophagen, die sich zu lipidspeichernden Schaumzellen umwandeln können. (Immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen CD 68, einem Oberflächenprotein auf Makrophagen)

Aus der gesteigerten Durchlässigkeit des Endothels für Plasmaproteine resultiert eine Akkumulation von LDL im subendothelialen Raum und deren Oxidation. Sie wirken chemotaktisch für Monozyten, die sich zu Makrophagen umwandeln und den Scavenger-Rezeptor exprimieren, an den die modifizierten Lipoproteine binden. Durch ihre Aufnahme entstehen lipidspeichernde Schaumzellen, die große Mengen Gewebsthromboplastin bilden, eine hochpotente prokoagulante Substanz [43], die im Falle der Plaqueruptur zur akuten Thrombose des betroffenen Gefäßes führt.

Die Endothelzellen und eingewanderten Entzündungszellen bilden eine Vielzahl verschiedener Zytokine, Chemokine wie, MCP-1, IP-10, MIG und I-TAC [42] und Wachstumsfaktoren, verstärken so die Leukozytenrekrutierung und bewirken die Einwanderung und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen. Die aktivierten Makrophagen können durch hydrolytische Enzyme fokale Nekrosen im subendothelialen Raum hervorrufen. Dieser Kreislauf bestehend aus Akkumulation mononukleärer Leukozyten, Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen mit der Bildung fibrösen Bindegewebes führt zur Vergrößerung und Umstrukturierung der Läsion und schließlich zur Bildung einer fibrösen Kappe über einem Kern aus Lipiden und nekrotischem Gewebe [64]. Kann das Gefäß nicht mehr kompensatorisch dilatieren [21] entsteht eine Stenose, die sich klinisch im Sinne einer stabilen Angina pectoris äußern kann. Unter dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine bilden die Makrophagen in der Läsion matrixdegradierende Proteine [78], die Kollagensynthese der glatten Gefäßmuskelzellen wird durch IFN- γ gehemmt [2], und es kommt zur Apoptose glatter Gefäßmuskelzellen [20]. So kann es zur Ausdünnung der fibrösen Kappe und schließlich zur Plaqueruptur kommen. Liegt der thrombogene Inhalt der Plaque offen, entsteht eine Thrombose, die als akutes Koronarsyndrom symptomatisch werden kann.

5.2.1 Die Rolle des Chemokins MCP-1 bei der Arterioskleroseentstehung

MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1) gehört zu einer bestimmten Gruppe chemotaktischer Zytokine, den Chemokinen. Strukturell ist es Mitglied der Unterfamilie der C-C-Chemokine. Neben Endothelzellen können Monozyten, Fibroblasten, glatte Gefäßmuskelzellen und viele andere Zellen MCP-1 bilden [73]. Die Expression wird von Lipopolysaccharid, verschiedenen Interleukinen, TNF α , IFN γ und AGEs stimuliert [86]. Retinoin säure, Glukokortikoide und Östrogen können die Genexpression inhibieren [59].

MCP-1 übt seine Wirkung auf Zielzellen über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aus, die nach Aktivierung zu Bildung von Inositol-Triphosphat, intrazellulärer Kalziumfreisetzung und Aktivierung der Proteinkinase C führen. Ein weiterer Signalweg beinhaltet die Aktivierung von Proteinen der Rho-Familie, welche die Zellmotilität regulieren [45].

Seine Hauptfunktion besteht in der chemotaktischen Wirkung auf Monozyten, T-Lymphozyten und basophile Granulozyten [25]. Aber auch die Extravasation, Adhäsion und Phagozytose von Makrophagen werden durch MCP-1 reguliert.

Die MCP-1- Bildung in Endothelzellen trägt entscheidend dazu bei, dass ein Chemokingradient zwischen Gefäßlumen und dem subendothelialen Raum entsteht und so Leukozyten angezogen werden, was einer der ersten Schritte in der Atherogenese ist.

Auch wenn die Regulation der MCP-1 Expression in Endothelzellen noch nicht vollständig verstanden ist, könnte eine medikamentöse Verminderung der Sekretion dieses Chemokins einen vielversprechenden Ansatz in der Modulation der Atherogenese darstellen [73].

5.2.2 Die Rolle des Adhäsionsmoleküls VCAM-1 bei der Arterioskleroseentstehung

VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) ist ein Adhäsionsmolekül der Immunglobulin-Superfamilie, dem eine zentrale Rolle bei der Adhäsion von mononukleären Zellen, wie Monozyten und T-Lymphozyten auf Endothelzellen zukommt [56]. VCAM-1 interagiert mit VLA-4, einem $\alpha 4\beta 1$ -Integrin, welches konstitutiv von Monozyten und Lymphozyten exprimiert wird und bewirkt hierüber die Anheftung dieser Zellen. Sodann vermittelt es die Öffnung der endothelialen Zellkontakte und ermöglicht so Leukozyten die Einwanderung in die Subintima [42].

Neben Endothelzellen, können glatte Gefäßmuskelzellen, Makrophagen, Fibroblasten und andere nichtendotheliale Zellen VCAM-1 exprimieren [56]. Die VCAM-1-Expression kann durch verschiedene proatherogene Faktoren, wie Hypercholesterinämie, AGEs, oxidierte LDLs und verschiedene Zytokine wie IL-1 und TNF α induziert werden. Verschiedene Antioxidantien wie Vitamin E oder Probucol können die Expression in vivo und in vitro vermindern [19]

Ebenso wie MCP-1 wird die VCAM-1-Expression über den Transkriptionsfaktor NF κ B reguliert.

Frühere Studien konnten eine endotheliale VCAM-1-Expression in frühen arteriosklerotischen Läsionen in Arterien von ApoE-defizienten Mäusen und von Kaninchen, welche mit cholesterinreicher Diät gefüttert wurden, zeigen [40, 31]. Auch in humanen fortgeschrittenen arteriosklerotischen Läsionen konnte VCAM-1 nachgewiesen werden, besonders auf glatten Gefäßmuskulzellen und Makrophagen in tieferen subendothelialen Schichten, nahe der Lamina elastica interna. Dies führte zu der Annahme, dass die Entzündungszellen nicht nur vom arteriellen Lumen, sondern auch von den vasa vasorum und der hiervon ausgehenden Neovaskularisation einwandern [56].

Da Monozyten mit 80% den größten Teil an leukozytären Zellen in einer arteriosklerotischen Läsion ausmachen, kommt VCAM-1 und MCP-1, welche maßgeblich deren Rekrutierung in den subendothelialen Raum steuern, eine große Bedeutung für frühe Schritte der Atherogenese zu. Eine medikamentöse Beeinflussung ihrer Expression könnte einen vielversprechenden Ansatz in der Therapie der Arteriosklerose darstellen.

5.3 Die Bedeutung von AGEs/ RAGEs bei der Atherogenese

Bei Diabetikern stellen nichtenzymatisch glykierte Endprodukte, sogenannte advanced glycation endproducts (AGEs) einen entscheidenden Stimulus der inflammatorischen Reaktion in vaskulären Zellen dar [69].

AGEs waren ursprünglich lediglich durch ihre gelbbraune-fluoreszierende Farbe und durch die Tatsache, dass sie zu Aminogruppen Quervernetzungen (crosslinks) bilden können, charakterisiert. Der klassische Weg der AGE-Entstehung wird auch Maillard-Reaktion genannt und verläuft über die nichtenzymatische Reaktion zwischen Glucose oder anderen reduzierenden Zuckern in der offenen Aldehydform mit freien N-terminalen und/oder ϵ -ständigen Aminogruppen in Makromolekülen wie Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren. Über die reversible Bildung eines Aldimins, einer sogenannten Schiff'schen Base, entsteht durch reversible, intramolekulare Umbauvorgänge ein Ketoamin, ein sogenanntes Amadori-Produkt. Die offene Kettenform des Ketoamins kann mit anderen Aminogruppen reagieren. Durch Oxidation, Dehydrierung und Kondensationsreaktionen entstehen irreversibel quervernetzte Komplexe, die AGEs, die nur noch schlecht abbaubar sind [6].

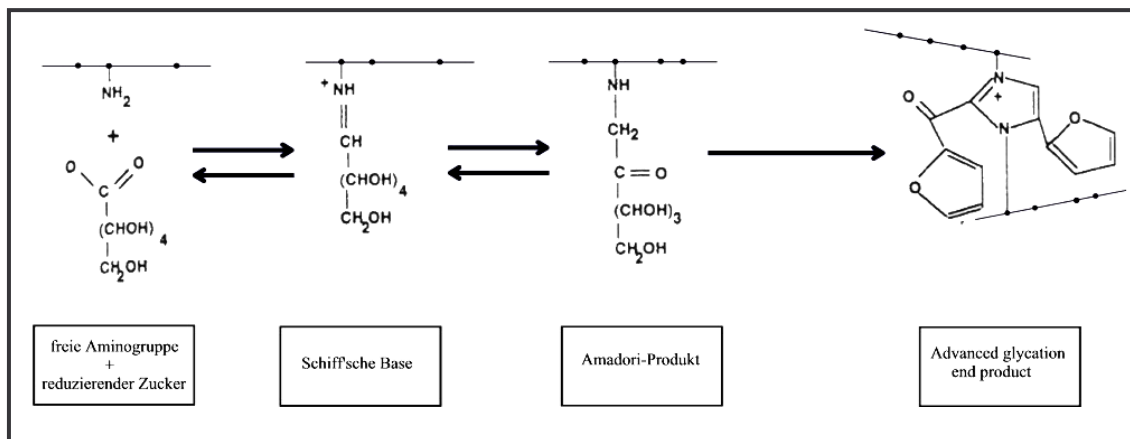


Abbildung 2: Schematische Darstellung der AGE-Entstehung modifiziert nach [6]

Glucose oder andere reduzierende Zucker reagieren in der offenen Aldehydform mit freien N-terminalen und/oder ϵ -ständigen Aminogruppen in Makromolekülen wie Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren. Über die reversible Bildung eines Aldimins, einer sogenannten Schiff'schen Base, entsteht durch reversible, intramolekulare Umbauvorgänge ein Ketoamin, ein sogenanntes Amadori-Produkt. Die offene Kettenform des Ketoamins kann mit anderen Aminogruppen reagieren. Durch Oxidation, Dehydrierung und Kondensationsreaktionen entstehen irreversibel quervernetzte Komplexe, die Advanced glycation end products.

Durch diese konzentrationsabhängige Reaktion kann eine Vielzahl langlebiger Strukturproteine wie zum Beispiel Kollagen, Laminin oder auch kurzlebige Proteine wie Immunglobuline verändert werden [74, 11], was vermehrt bei chronischen Entzündungen, erhöhtem Blutzuckerspiegel und bei lokalem oder systemischen oxidativem Stress [69] geschieht.

Beim Diabetiker konnte die Ablagerung von AGEs in einer Vielzahl von Geweben, wie in der Gefäßwand, Haut und Makrophagen in höherem Maße als beim Gesunden nachgewiesen werden [74, 65].

Die abgelagerten AGEs fördern über verschiedene Mechanismen die Entstehung arteriosklerotischer Läsionen. Neben Veränderungen des Gerinnungssystems, wie gesteigerter Thrombozytenaggregation, induzieren sie die Entstehung freier Radikale und die Verminderung der Konzentration an vasodilatatorischem Stickstoffmonoxid, wodurch oxidativer Stress entsteht. Unter diesen Bedingungen kann es zur Verdickung der Gefäßwand, folglich zu Elastizitätsverlust und endothelialer Dysfunktion kommen. Subendotheliale Strukturproteine wie Kollagen oder Laminin werden durch die Bildung von Quervernetzungen (crosslinks) verändert, was zu einer gesteigerten vaskulären Permeabilität und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen führt und so die Arterioskleroseentstehung erleichtert [74].

Zudem wurden verschiedene Zelloberflächenrezeptoren identifiziert, an die AGEs binden können. Macrophage scavenger receptor Typ I und II, receptor for AGE (RAGE), oligosaccharyltransferase-48 (AGE-R1), 80K-H phosphoprotein (AGE-R2) und Galectin-3 (AGE-R3) werden von verschiedenen Zellen, zum Beispiel von Endothelzellen, Monozyten, Makrophagen und Mikroglia exprimiert [83]. Aber lediglich die Bindung an RAGE kann intrazelluläre Signalmechanismen aktivieren und so proinflammatorische Effekte mediieren [68].

RAGEs, Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie, sind 35 kD Proteine [55], die von Endothelzellen, Gefäßmuskelzellen, T-Lymphozyten, mononukleären Zellen, Neuronen, Fibroblasten und mesangialen Zellen exprimiert werden [10,30]. Die Aktivierung von RAGEs führt über einen Signalweg, der p21^{ras}, die Phosphatidylinositol-3 Kinase und Mitogen-Aktivierte-Protein (MAP) Kinasen einschließt, zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nuclear Factor- kappa B (NFκB) [79] und so zur Induktion der Expression proinflammatorischer und prokoagulatorischer Gene, wie MCP-1, VCAM-1, M-CSF, Endothelin-1, TNFα oder Gewebsthromboplastin [66, 15,67,69].

Zur Aktivierung von RAGEs sind neben AGEs auch proinflammatorische Peptide der S100/ Calgranulin Familie fähig, hierbei handelt es sich um Moleküle, die von polymorphkernigen Leukozyten freigesetzt werden und im Rahmen chronisch-entzündlicher Prozesse akkumulieren [29]. Weiterhin lassen sich RAGEs durch β-Amyloid [88,90], das in der Pathogenese der Alzheimer Erkrankung bedeutend ist, und durch Amphoterin aktivieren, einem Nicht-Histon-Protein, der high-mobility Gruppe I. Die Amphoterin-RAGE Interaktion ist beim Wachstum von Neuriten ebenso beteiligt wie bei der Zellmigration und -invasion bei Tumorwachstum [79, 30].

Endothelzellen zeigen eine basale RAGE-Expression, die durch Stimulation der Zellen mit AGEs, TNFα oder β-Östradiol verstärkt werden kann. Diese Expressionsinduktion wird auf transkriptioneller Ebene durch Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFκB bei AGEs und TNFα, bzw. SP-1 bei β-Östradiol vermittelt [82]. Nach gegenwärtigem Konzept verstärkt die Interaktion von RAGE mit den genannten Liganden die Rezeptorexpression und initiiert so eine sich selbst verstärkende Spirale der Zellaktivierung [41]. Hemmung der RAGE-Synthese durch Transfektion von RAGE-Antisense-Oligonukleotiden oder Blockierung der AGE-Rezeptoren mit neutralisierenden Antikörpern führt zur Inhibition der AGE-vermittelten vaskulären Hyperpermeabilität und endothelialen Dysfunktion [89, 5]. Tierexperimentelle Daten konnten zeigen, dass eine Hemmung der AGE-RAGE-Interaktion zu einer deutlichen Verminderung der Arteriosklerose im atherogenen

Mausmodell führt [57]. Neuere in vitro-Experimente zeigen, dass sowohl die basale als auch die TNF α -induzierte RAGE-Expression in Endothelzellen konzentrationsabhängig durch PPAR γ -Aktivatoren reduziert werden kann [52]. Allerdings ist noch völlig unklar, inwieweit diese Effekte eine funktionelle Relevanz auf die Atherogenese haben.

5.4 Die nukleären Transkriptionsfaktoren: Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs)

Anfänglich als Rezeptoren für lipidsenkende Substanzen identifiziert, die in der Leber von Nagetieren zur Vergrößerung von Peroxisomen führen, wurden PPARs in neueren Arbeiten als nukleäre Transkriptionsfaktoren beim Menschen charakterisiert, die viele Stoffwechselwege im menschlichen Körper zu regulieren scheinen. So konnten Daten der letzten Jahre zeigen, dass eine Aktivierung dieser Mitglieder der nukleären Rezeptorfamilie auch bei der Arterioskleroseentstehung von Bedeutung ist.

PPARs, sind ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren, welche die Expression spezifischer Zielgene regulieren [71, 72]. Sie besitzen eine Liganden-, sowie eine DNA-Bindungsdomäne. Nach Aktivierung durch ihre Liganden bilden PPARs Heterodimere mit dem Retinoic X receptor (RXR) und binden an definierte PPAR-response elements (PPRE) in der Promoterregion ihrer Zielgene. Diese PPRE gehören in die Kategorie der Direct-repeat 1- Sequenzen (DR-1), das heißt sie bestehen aus zwei Hexanukleotidsequenzen, die durch ein einzelnes Nukleotid getrennt sind [17, 70].

Bisher sind drei PPAR-Unterformen bekannt: PPAR-alpha (α), gamma (γ) und delta (δ), die eine 60-80%-ige Homologie in ihren Liganden- und DNA-Bindungsdomänen besitzen und sich durch ihre Liganden und die beeinflussten Zielgene unterscheiden [71]. Initial charakterisiert als Regulatoren im Lipidstoffwechsel, bzw. der Adipogenese, zeigen Arbeiten der letzten Jahre, dass PPAR α und PPAR γ anti-inflammatorische Wirkungen in vaskulären Zellen haben.

PPAR δ scheint ubiquitär exprimiert zu werden, doch sind spezifische Liganden und die Funktion bislang weitgehend unbekannt.

PPAR α reguliert vor allem die Genexpression im Lipidmetabolismus [35]. Aktivatoren für diesen Rezeptor sind vielfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA), wie Docosahexanoic acid (DHA), Eicosapentanoic acid (EPA) oder Eicosatetranoic acid (ETYA), Eicosanoide [35], sowie lipidsenkende Fibratderivate, wie Fenofibrat, WY 14643 oder Gemfibrozil [18]. PPAR α wird in unterschiedlichen Organen, wie Leber, Herz und Niere exprimiert [3].

In den letzten Jahren konnte die Expression von PPAR α in glatten Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen und Monozyten, bzw. Makrophagen in vivo und in vitro gezeigt werden [47]. Verschiedene Arbeiten der letzten Jahre zeigen, dass eine PPAR α -Aktivierung in diesen Zellen eine antiatherogene Wirkung haben könnte [51, 76].

PPAR γ ist einer der zentralen Mediatoren der Genregulation in der Adipogenese [84]. Zu den Aktivatoren für PPAR γ zählen ProstaglandinD2-derivat, 15-deoxy-d12, 14-ProstaglandinJ2 [34], oxidierte Linolensäure (9[S]-, und 13[S] HODE), sowie eine Gruppe neuer Antidiabetika, die Thiazolidindione [39], sowie neuere synthetische Agonisten (GW 7845). Die Thiazolidindione, wie Troglitazon, Pioglitazon oder Rosiglitazon (BRL 49653) befinden sich in Europa und den USA bereits in klinischer Anwendung, wobei Troglitazon inzwischen vom Markt gezogen wurde, da sich diese Substanz als hepatotoxisch erwies. In Deutschland sind zur Zeit Rosiglitazon und Pioglitazon in Kombinationstherapie mit Sulfonylharnstoffen oder Metformin zur Behandlung des Diabetes mellitus Typ II zugelassen.

PPAR γ wird von Endothelzellen, T-Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen und glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert, wobei für den Grad der Expression in letzteren widersprüchliche Daten existieren [47, 46]. PPAR γ -Aktivierung scheint über verschiedene Mechanismen wie zum Beispiel Verminderung der Zytokinproduktion in Endothelzellen der Atherogenese entgegenzuwirken [48].

Nach der jetzigen Datenlage, auch wenn wenig in vivo Daten und nur kleine klinische Studien existieren, scheint der Gesamteffekt einer PPAR γ -Aktivierung günstig zu sein und die Arterioskleroseentstehung zu verlangsamen.

5.5 Fragestellung

Da Studien der letzten Jahre zeigen konnten, dass die Hemmung der RAGE-Expression durch antisense-Oligonukleotide die AGE-induzierte NF κ B-Aktivierung und somit auch die Bildung proinflammatorischer Zytokine reduziert, soll die vorliegende Arbeit klären, inwieweit eine Verminderung der RAGE-Expression durch PPAR γ -Aktivatoren einen ähnlichen Effekt hat.

Hierzu soll die AGE-induzierte Expression des Chemokins MCP-1 und des Adhäsionsmoleküls VCAM-1 in humanen Endothelzellen untersucht werden, von denen bekannt ist, dass sie durch RAGE-Aktivierung und den nachfolgenden Signalweg, der NF κ B beinhaltet, moduliert werden. Da zudem gezeigt wurde, dass MCP-1 und VCAM-1 nicht direkt durch PPAR γ reguliert werden, müsste eine PPAR γ -Aktivierung mit Rosiglitazon und Pioglitazon in diesen Zellen zunächst die RAGE-Expression vermindern und so die Ansprechbarkeit der Zellen für AGEs reduzieren. Als Kontrolle werden die PPAR γ -Effekte auf die TNF α -induzierte MCP-1- und VCAM-1- Expression, die über NF κ B vermittelt wird, untersucht.

6 MATERIAL UND GERÄTE

6.1 Chemikalien

Acrylamid 30%	Bio Rad
Agarose	Life Technologies
Aqua Spüllösung	Delta-Pharma
APS	Sigma
β -Amyloid, human	Calbiochem
β -Mercaptoethanol	Fluka
Borsäure	J.T. Baker
BSA (Bovines Serum Albumin)	Sigma
Bromphenolblau-Laufpuffer	Sigma
Denhardtts	Mallinckrodt
DEPC	Sigma
DTT	Sigma
DMEM	PAA Laboratories
EDTA	Sigma
Ethanol	Riedel-de Haen
Etidiumbromid	Promega Corporation
FCS	PAA Laboratories
Formaldehyd 37%	Roth
Formamid	Merck
Glycerol	J.T. Baker
Glycin	Roth
H ₂ SO ₄	Sigma
HEPES	Sigma
KCl	Fluka
Kollagen	Sigma
Kollagenase	Boehringer
MgCl ₂	Fluka
MOPS	Sigma

Mowiol	Calbiochem
NaCl	Delta-Pharma
NaN ₃	Merck
Natriumacetat	Mallinckrodt
Natriumcitrat	Mallinckrodt
Nonidet-40	USB
PBS	Life Technologies
Pioglitazon	Takeda Chemical Industries
PMSF	Sigma
PolyIdC	Boehringer
Rosiglitazon	Smith Kline Beecham
Salmon Sperm	Amersham Pharmacia
SDS	Roth
Sucrose	Sigma
TEMED	Sigma
TNF α , human	Sigma
Trizma Base	USB
Tween 20	Sigma

6.2 Radioaktive Reagenzien

α -dCTP ³²	Amersham Pharmacia
------------------------------	--------------------

6.3 Antikörper

Anti- α -SM-Aktin	Sigma
Anti-von-Willebrand-Faktor	Dakopatts GmbH
Ziege-Anti-Kaninchen-FITC	Dianova
Ziege-Anti-Maus-TRITC	Dianova

6.4 Oligonukleotide

Ig κ :5'-CTA GTC TCA ACA GAG GGG ACT TTC CGA GAG GCC AT-3'	MWG-Biotech AG
--	----------------

6.5 Molekularbiologische Kits

Duoset [®] ELISA Development System	R&D Systems
Rediprime Labelling System II	Amersham
Micro BCA [™] Protein Assay	Pierce
RNeasy [®] Mini Kit	Qiagen

6.6 Puffer und Lösungen

• Northern Blots

<u>Agarose-Gel</u>	2,4 g Agarose 144 ml Aqua Spüllösung 200 ml Laufpuffer 10x 36 ml Formaldehyd 37 %
<u>DEPC-H₂O</u>	200 ml DEPC ad. 1000 ml Aqua dest
<u>Hybridisierungspuffer</u>	100 ml deionisiertes Formamid 10 ml Denhardts 100x 50 ml SSC 20x 5 ml SDS 20 % 33 ml Aqua dest. 2 ml Salmon Sperm (10 mg/ml)
<u>Master-Mix</u>	5 µl DEPC-H ₂ O 15 µl NSB 3,5 µl Bromphenolblau 0,1 µl Etidiumbromid
<u>Northern Solution Buffer (NSB)</u>	200 µl deionisiertes Formamid 70 µl Formaldehyd 37 % 40 µl Laufpuffer 10x

<u>Laufpuffer10x</u>	41,2 g MOPS 3,28 g Natriumacetat ad. 900 ml Aqua dest. 10 ml EDTA 0,5 M
<u>SSC 20x</u>	175,3 g NaCl 88,2 g Natriumcitrat ad. 1000 ml Aqua bidest. pH: 7,0
<u>Waschlösung I</u>	447,5 ml Aqua dest 50 ml SSC 20x 5 ml SDS 20 %
<u>Waschlösung II</u>	495 ml Aqua dest. 2,5 ml SSC 20x 2,5 ml SDS 20 %
• EMSA	
<u>Glycerol-Puffer</u>	20 mM HEPES, pH: 7,9 100 mM KCl 0,2 mM EDTA 20 % Glycerol
<u>EMSA-Puffer</u>	100 mM Tris-Cl, pH: 7,5 500 mM NaCl 10 mM EDTA 50 % Glycerol
<u>High-Salt-Buffer</u>	20 mM HEPES, pH: 7,9 1,5 mM MgCl ₂ 0,2 mM EDTA 420 mM NaCl 1 mM DTT

	0,5 mM PMSF
<u>Low-Salt-Buffer</u>	10 mM HEPES, pH: 7,9 1,5 mM MgCl ₂ 10 mM KCl 0,5 % Nonidet-40 1 mM DTT 0,5 mM PMSF
<u>Polyacrylamidgel 5%</u>	6,6 ml Acrylamid 30 % 31 ml Aqua dest. 2 ml 10x TBE 80 ml TEMED 400 ml APS 10 %
<u>TBE-Puffer 10x</u>	pH: 8,3 890 mM Trizma Base 890 mM Borsäure 20 mM EDTA
<u>TE-Puffer</u>	10 mM Tris-HCl, PH: 7,4 1 mM EDTA
<u>Tris-buffered Saline</u>	20 mM Trizma Base 150 mM NaCl
• ELISA	
<u>ELISA Blockpuffer</u>	PBS 1 % BSA 5 % Sucrose 0,05 % NaN ₃
<u>PBST</u>	PBS 0,1 %, Tween 20

Reagent Diluent

Tris-buffered Saline

0,1 % BSA

0,05 % Tween 20

6.7 Zellkulturmaterial

EBM

Promocell

ECGS

Promocell

Gentamycin

Life Technologies

Glutamin

Life Technologies

Medium Endothelzellen

500 ml EBM

50 µl Gentamycin

2,5 ml Glutamin

2,5 ml Penicillin / Streptomycin

50 ml FCS

2 ml ECGS

Mowiol

2,4 g Mowiol 4-88

6 ml Glycerin

6 ml Aqua dest.

12 ml 0,2 M Tris-Puffer, PH:8,5

Penicillin / Streptomycin

Biochrom

6.8 Verbrauchsmaterial

Chromatographiepapier 3MM

Whatman International

Nylonmembran

Hybond, Amersham Pharmacia

Reaktionsgefäße 1,5ml

Safe Lock, Eppendorf

Reaktionsgefäße 15 und 15ml

FALCON, Becton Dickinson

Reaktionsplatten

96-well, Greiner

Röntgenfilme

Hyperfilm, Amersham Pharmacia

Zellkulturplatten

MULTIWELL, Becton Dickinson

Zellkulturschalen 100mm

FALCON, Becton Dickinson

Zellkulturschalen 100mm	FALCON, Becton Dickinson
Zellschaber	FALCON, becton Dickinson

6.9 EDV

Softmax® Version 2.01	Molecular Devices Corp.
-----------------------	-------------------------

6.10 Geräte

Brutschrank	Heraeus
Crosslinker	Fluo-Link FLX, Biometra
ELISA reader	DPC
ELISA washer	TECAN
EMSA-Kammer	Bio Rad
Gelkammer	Biometra
Hybridisierungssofen	Heraeus
Hybridisierungsröhrchen	Biometra
Laminar Air Flow Bench	Heraeus
Mikroskop	Leica
Netzgerät	Biometra
Neubauerkammer	Brand
Photometer	Beckman
Pipetten	Gilson
Röntgenkassetten	Rego
Sephadex G-25 DNA-Säule	Amersham
Thermomixer	Eppendorf
Vakuum-Geltrockner	Savant
Vakuumtrockner	SpeedVac, Savant
Zentrifuge	Varifuge 3.OR, Heraeus

7 METHODEN

7.1 Zellbiologische Methoden

7.1.1 Isolation und Kultivierung von Endothelzellen

Zur Durchführung der Experimente wurden humane Endothelzellen aus Abschnitten humaner Umbilikalvenen isoliert.

Nachdem das Gefäß von umgebendem Gewebe befreit war, wurde es in einer Zellkulturschale mit einer Lösung aus 25 ml DMEM mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin gespült, um Blutreste zu entfernen. Danach wurde es mit einer Kollagenaselösung (1 mg/ml in PBS) gefüllt und auf beiden Seiten abgeklemmt. Nach 30 Minuten wurde die Vene gespült und für 30 weitere Minuten erneut mit Kollagenaselösung gefüllt, so dass ein zweiter Verdau stattfinden konnte. In der Zwischenzeit wurden drei Vertiefungen einer Zellkulturplatte mit Kollagenase beschichtet. Nach der Inkubationszeit wurde die Vene über einem 15 ml-Reaktionsgefäß mit 10 ml DMEM mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin geöffnet und fünfmal gründlich mit der Kollagenaselösung gespült. Nun wurde das Reaktionsgefäß bei 1000 RPM fünf Minuten zentrifugiert. Daraufhin wurden die Zellen in 3 ml Endothelzellmedium resuspendiert und in die vorbereiteten Zellkulturplatten gegeben.

Die Zellen wurden bei zweitägigem Mediumwechsel kultiviert. Als die Zellen konfluent waren, wurden sie in Zellkulturschalen ausgesät und erneut bis zur Konfluenz kultiviert. Für die Experimente wurden Zellen der Passagen fünf bis sieben verwendet.

7.1.2 Fluoreszenzmethoden zur Überprüfung der Zellreinheit

Um die Reinheit der kultivierten Endothelzellen zu bestimmen, wurden sie mit Immunfluoreszenz auf die Expression von von-Willebrand-Faktor, einem spezifischen, endothelialen Oberflächenprotein, untersucht. Dazu wurden die Zellen auf Deckgläsern ausgesät, mit eiskaltem Methanol fixiert, in PBS gewaschen und mit einem Kaninchen-Antikörper, der für von-Willebrand-Faktor spezifisch ist (57 µg/ml) 40 Minuten lang bei 37 °C inkubiert. Nun wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit dem

Sekundärantikörper, einem mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC markierten Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper, unter denselben Bedingungen in einer Konzentration von 50 µg/ml inkubiert. Danach wurden die Zellen wieder mit PBS gespült, mit Mowiol eingedeckt und nach einer Stunde Aufbewahrung bei 4 °C unter dem Immunfluoreszenzmikroskop betrachtet.

Durch eine Färbung auf die Expression von α -Aktin, einem spezifischen Protein in glatten Muskelzellen, konnte ausgeschlossen werden, dass glatte Gefäßmuskelzellen vorlagen. Hiefür wurden die Zellen mit dem α -Aktin spezifischen Maus-Antikörper in einer Konzentration von 1 mg/ml inkubiert und mit einem Ziege-Anti-Maus-Antikörper (43 µg/ml) fluoreszenzmarkiert.

Wenn bei beiden Tests keine fluoreszierenden Zellen gesehen werden konnten, lagen Fibrozyten vor, die weder α -Aktin noch Myosin exprimieren.

7.2 Stimulation der Zellen

Zur Untersuchung der Effekte der PPAR-Aktivatoren auf die AGE-induzierte MCP-1 und VCAM-1 Expression wurden die Zellen gemäß des nachfolgenden Schemas stimuliert. Es wurden die PPAR γ -Aktivatoren Pioglitazon und Rosiglitazon und als RAGE-Aktivatoren β -Amyloid und AGE-BSA verwendet. Die Negativkontrolle blieb unstimuliert, um eine PPAR-Aktivierung, durch andere Faktoren als die beigefügten Stimulantien ausschließen zu können. Als Positivkontrolle wurde TNF α verwendet, ein direkter NF κ B-Aktivator, der die MCP-1- und VCAM-1-Expression direkt induziert. Während der Stimulation und kurz vor den Experimenten, wurden die Zellen unter dem Mikroskop auf ihre Vitalität untersucht.

Für die ELISAs, Gelshift- und Northern-Blot-Experimente variierte die Dauer der Zellstimulation.

Für die Untersuchung der MCP-1-Expression im ELISA wurde die Vorbehandlung mit den PPAR γ -Aktivatoren Rosiglitazon und Pioglitazon über 24 Stunden durchgeführt, danach die 16-stündige Stimulation mit AGE-BSA, β -Amyloid und TNF α . Für die Gelshift- und Northern-Blot-Experimente wurden die Zellen nach der 24-stündigen Vorbehandlung drei Stunden lang mit β -Amyloid und TNF α stimuliert. Abgesehen von der unterschiedlichen Dauer der Stimulation wurde somit folgendes Schema verwendet.

Tabelle 1: Schema der Stimulation der verwendeten humanen Endothelzellen vor der Durchführung weiterer Versuche. Die Vorstimulation erfolgte zum Beispiel vor der Durchführung von Northern Blots und Gelshifts 24 Stunden lang mit den angeführten PPAR γ -Aktivatoren Rosiglitazon und Pioglitazon in den angegebenen Konzentrationen, danach erfolgte die dreistündige Stimulation, wie angeführt.

Bedingung	Vorstimulation 24 Stunden	Stimulation 3 Stunden
1. Negativkontrolle	-	-
2. Positivkontrolle (TNF α)	-	TNF α (25 ng/ml)
3. β -Amyloid/ AGE-BSA	-	β -Amyloid (1 μ M)/ AGE-BSA (500ng/ml)
4. Rosiglitazon + β -Amyloid/ AGE-BSA	Rosiglitazon (10 μ mol/l)	β -Amyloid (1 μ M)/ AGE-BSA (500ng/ml)
5. Pioglitazon + β -Amyloid/ AGE-BSA	Pioglitazon (10 μ mol/l)	β -Amyloid (1 μ M)/ AGE-BSA (500ng/ml)
6. Rosiglitazon + TNF α	Rosiglitazon (10 μ mol/l)	TNF α (25 ng/ml)
7. Pioglitazon + TNF α	Pioglitazon (10 μ mol/l)	TNF α (25 ng/ml)

(Abkürzungen: TNF α : Tumornekrosefaktor α , AGE-BSA: advanced glycation enproducts-Bovines Serum Albumin)

7.3 Gelshiftanalyse/Electro Mobility Shift Assay (EMSA)

Die Gelshiftanalyse dient der Überprüfung von Protein/DNA Bindungen. Proteine, wie der Transkriptionsfaktor NF κ B, die nach Aktivierung an Doppelstrang-DNA einer spezifischen Sequenz binden, werden identifiziert, indem radioaktiv markierte Oligonukleotide, die zu dieser Sequenz korrespondieren, zugegeben werden. Die proteingebundene DNA wird mittels Elektrophorese durch ein Polyacrylamidgel unter nicht denaturierenden Bedingungen von der ungebundenen DNA, die schneller durch das Gel wandern kann, getrennt [9].

7.3.1 Isolierung von nukleären Extrakten

Nach der Stimulation wurden die Zellkulturschalen 10 Minuten lang auf Eis gestellt, um die Reaktion zu beenden. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Nun wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und dann in 1 ml PBS aus

der Schale abgeschabt. Die abgeschabten Zellen wurden in ein Eppendorfgesäß überführt und 10 Minuten bei 3600 RPM zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Das verbleibende Zellpellet wurde in 80 µl Low Salt Buffer (→ 6.6) resuspendiert und 10 Minuten lang inkubiert, so dass in dieser Zeit die Zellen aufgrund des osmotischen Gradienten lysiert wurden. Durch erneutes Zentrifugieren (5 Minuten bei 1300 RPM) ließen sich die Zellkerne vom Zytosol trennen, welches abgesaugt und verworfen wurde. Nun wurden die Zellkerne nochmals in 80 µl Low Salt Buffer resuspendiert und zentrifugiert, um einen höheren Reinheitsgrad zu erzielen. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet aus Zellkernen in 40 µl High Salt Buffer (→ 6.6) resuspendiert und eine halbe Stunde inkubiert. In dieser Zeit kommt es zu Membranstörungen des Zellkerns, der Kerninhalt diffundiert heraus und nach fünfminütigen Zentrifugieren konnte der Überstand, die nukleären Proteine, abpipetiert werden. Nach der Zugabe von 40 µl Glycerolpuffer (→ 6.6) und 0,4 µl DTT (0,1 M) wurden die nukleären Extrakte bei -70 °C eingefroren oder sogleich für die Gelshifftanalyse weiterverarbeitet. Vor Zugabe des DTT wurden Aliquots für die Bestimmung der Proteinkonzentration abgenommen.

7.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung wurde nach der kolorimetrischen BCA-Methode mit dem Micro BCA™ Protein Assay der Firma Pierce durchgeführt [75]. Diese Methode beruht darauf, dass Cu^{2+} in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration zu Cu^+ reduziert wird. Cu^+ bildet mit Bicinchoninsäure einen Komplex, der bei 562 nm photometrisch messbar ist. Über die lineare Regression lässt sich so die Proteinkonzentration ermitteln. Zur Erstellung einer Eichgerade wurden Proteinstandards (Albumin) in absteigender Konzentration von 60 µg/ml bis 0 µg/ml in eine 96-well-Platte pipettiert. Die zu bestimmende Proteinlösung wurde im Verhältnis 1:50 mit Aqua dest. verdünnt. Sowohl für die Eichwerte als auch für die Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Von dem BCA-Reagenz wurden 100 µl zu jeder Probe zugegeben, der Ansatz zwei Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend die Extinktion bei 562 nm gemessen.

7.3.3 Radioaktive Markierung der DNA-Sonde

Hierzu wurde 1 µl doppelsträngiger Oligonukleotide einer NFκB-Konsensus-Sequenz (Igc: 5'-CTA GTC TCA ACA GAG GGG ACT TTC CGA GAG GCC AT-3') in der

Konzentration 10 pmol/ml) mit 44 µl TE-Puffer auf 45 µl verdünnt und bei 95 °C 10 Minuten lang denaturiert. Nach Zugabe des Ansatzes in das Rediprime II Labelling System (Amersham), welches dATP, dGTP, dTTP, exonukleasefreie Klenowenzyme und Primer enthält, wurden 5 µl α -dCTP³² hinzugefügt. Bei 37 °C wurde in 10 Minuten Inkubationszeit das radioaktive Cytosintriphosphat in die neusynthetisierte DNA eingebaut. Nachdem die Reaktion mit 5 µl 0,2 M EDTA gestoppt wurde, wurde der Ansatz mit 200 µl TE-Puffer auf eine Sephadex G-25-Säule gegeben, um nicht eingebaute Nukleotide abzutrennen und die Sonde aufzureinigen. Die Säule wurde mehrfach mit Puffer durchgespült, das Eluat aufgefangen und jenes, das die höchste Radioaktivität aufwies, wurde bei -20 °C aufbewahrt und zur Gelshiftanalyse weiterverwendet.

7.3.4 Herstellung eines 5%-igen, nicht-denaturierenden Polyacrylamidgels

Zu Beginn wurden zwei Gelglasplatten mit Alkohol gereinigt und zwei Spacer zwischen die Glasplatten gelegt. Dann wurden die Glasplatten fixiert und 13,2 ml 30% Polyacrylamid, 4 ml 10x TBE und 62 ml Aqua dest. vermischt. Durch die Zugabe von 800 µl 10 % APS und 160 µl TEMED begann das Gel zu polymerisieren und musste zügig in den Zwischenraum zwischen den Platten gegossen werden. Nachdem man einem Kamm eingesetzt hatte, ließ man das Gel eine Stunde polymerisieren, entfernte dann den Kamm und spülte die Taschen mit 0,5x TBE. Gemäß den Anweisungen des Herstellers wurde das gegossene Gel in die Halteapparatur eingesetzt, die obere und untere Kammer mit Laufpuffer (0,5x TBE) befüllt und mit den zu untersuchenden Proben beladen.

7.3.5 Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Hierzu wurden 5 µg der nukleären Extrakte mit 2 µl 10x EMSA-Puffer (→ 6.6), 1 µl Poly dIdC (0,1 µg/ml) und 2 µl radioaktiv markiertes Oligonukleotid mit Aqua dest. auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden der Ansatz und der Marker Bromphenolblau jeweils in eine Tasche des nativen Polyacrylamidgels gegeben und die Elektrophorese in 0,5x TBE-Puffer gestartet. Die Laufzeit betrug bei 250 Volt unter Gegenkühlung 1,5 Stunden. Danach wurde der Laufpuffer verworfen, die Fixierung der Glasplatten gelöst und eine der Glasplatten vorsichtig abgehoben. Nun wurde das Gel auf Whatmanpapier gelegt mit

Zellophanfolie abgedeckt und bei 80 °C zwei Stunden lang auf einem Gelrockner getrocknet. Anschließend wurde der DNA-Proteinkomplex mittels Autoradiographie detektiert. Die Spezifität der Bindung wurde mit nicht markiertem Oligonukleotid in hohem Überschuss geprüft. Dies sollte durch Konkurrenz eine Abschwächung oder das Verschwinden der Bande bewirken, welche die DNA-Proteinbindung anzeigt.

7.4 Northern Blot

Northern Blots dienen dem Nachweis einzelner RNAs mittels spezifischer Sonden. Dazu wird die RNA in einem Agarosegel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer Sonde hybridisiert.

7.4.1 RNA-Isolierung

Um die PPAR-Effekte auf die RNA-Expression zu untersuchen wurde die Gesamt-RNA aus Endothelzellen mit dem RNeasy- Mini-Kit[®] (Quiagen) isoliert und dann mittels Northern-Blot-Hybridisierung analysiert.

Die Zellen wurden mit Lysepuffer aus dem Kit und β -Mercaptoethanol lysiert und aus den Zellkulturschalen geschabt. Danach wurde die Zellsuspension nach den Angaben des Herstellers mit dem RNeasy-Mini-Kit[®] weiterverarbeitet. Die Elution erfolgte mit RNase-freiem Wasser. Um gleiche Mengen an RNA für die Northern-Blot-Analyse verwenden zu können, wurde eine photometrische Konzentrationsbestimmung durchgeführt. Diese beruht auf dem Absorptionsmaximum der aromatischen Ringe der Basen bei 260 nm Wellenlänge. So gilt annäherungsweise für RNA in einer Quarzglasküvette mit der Schichtdicke 1 cm, dass eine OD_{260} von 1, einer RNA-Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$ entspricht. Nach der Berechnung der Konzentration (Formel: $OD_{260} \times 40 \mu\text{g} \times \text{Verdünnung} / 1000 \mu\text{l} = \text{RNA } \mu\text{g}/\mu\text{l}$) wurden gleiche RNA-Mengen in Eppendorfgläser pipettiert und 30 Minuten in einem Vakuumtrockner getrocknet.

7.4.2 Agarosegel-Elektrophorese

Bei der Gelelektrophorese macht man sich eine Eigenart der Nucleinsäuren zu Nutze: Sie besitzen negative Ladungen, und zwar in etwa proportional zu ihrer molekularen Größe. Lässt man sie in einem konstanten elektrischen Feld über ein Agarose- oder Polyacryl-

amidgel mit unterschiedlich großen Poren wandern, so bleiben die DNA-Fragmente je nach ihrer molekularen Größe an unterschiedlichen Stellen im Gel hängen. Die Laufstrecke der Fragmente ist proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes. Kleinere Nukleotide legen also in der gleichen Zeit einen weiteren Weg im Gel zurück als große Nukleotide.

Für die Herstellung des Agarosegels (→ 6.6) wurde die Agarose mit Aqua dest. angesetzt und zum Kochen gebracht, bis sie vollständig gelöst war. Nach der Zugabe von MOPS-Laufpuffer und Formaldehyd wurde das Gel nach einer kurzen Abkühlung auf etwa 60 °C in einen Gelschlitten gegossen, wobei durch Einsetzen eines Kammes die Kammern für den Probenauftrag freigehalten wurden. Während das Gel aushärtete, wurden die getrockneten RNA-Proben in 23,6 µl Master Mix (→ 6.6) gelöst und in die Taschen des Gels gegeben. Das im Master Mix enthaltene Ethidiumbromid besitzt die Eigenschaft, sich zwischen die einzelnen Basen einer Nukleinsäure zu setzen („interkalieren“) und bei Bestrahlung mit ultraviolettem Licht (Wellenlänge 254 nm oder 300 nm) zu fluoreszieren. Das Gel wurde mit 1x MOPS als Laufpuffer begossen und die Elektrophorese bei 75 Volt über 3-4 Stunden gestartet. Nach dieser Zeit wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert, um die gleichmäßige Beladung mit den Proben zu kontrollieren.

7.4.3 Blotting/Transfer der RNA auf eine Nylonmembran

Die elektrophoretisch aufgetrennte RNA wurde mittels Kapillarblot vom Gel auf eine Nylonmembran übertragen. Dazu wurde auf eine mit 20x SSC gefüllte Schale eine Glasplatte gelegt, über die drei Lagen Filterpapier gelegt wurden, dessen Enden in das SSC-Bad eintauchten. Darauf wurde das Gel mit der Öffnung der Taschen nach unten gelegt. Überschüssige Bereiche wie unbenutzte Spuren oder die Ränder des Gels wurden vorher mit einem Skalpell abgeschnitten. Auf das Gel wurde die Nylonmembran und weitere 3 Lagen Whatman 3MM Filterpapier gelegt. Den Abschluss bildete ein 5-8 cm hoher Stapel aus Papierhandtüchern, der mit einem 0,5 kg Gewicht beschwert wurde. Die RNA wurde so bei Raumtemperatur über Nacht auf die Membran übertragen. Dann wurde die RNA auf dem Blot durch UV-Licht in einem Quervernetzer bei 322 nm Wellenlänge vernetzt. Die Hybridisierung wurde entweder sofort durchgeführt oder der Blot in Zellophanfolie gewickelt und bei 4 °C aufbewahrt.

7.4.4 Hybridisierung von Northern Blots mit spezifischen DNA-Sonden

Um die RNA auf der Membran nachzuweisen wurde ein sequenzhomologes DNA-Fragment radioaktiv markiert und als Sonde verwendet. Die Markierung wurde mit dem Rediprime II labelling system (Amersham) unter der Verwendung von α -dCTP³² durchgeführt. Dabei wurde nach den Anweisungen des Herstellers vorgegangen. Auf diese Weise wurden Sonden für MCP-1, VCAM-1 und GAPDH, einem konstitutiv exprimierten Enzym, hergestellt.

Die Membran wurde zuerst 6-8 Stunden bei 42 °C mit 10 ml Hybridisierungspuffer prähybridisiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Nach dem Zufügen der bei 100 °C denaturierten Sonde wurde der Blot 12 h lang in einem Hybridisierungssofen unter ständiger Rollbewegung bei 42 °C inkubiert.

Danach wurde der Blot zweimal mit Waschlösung I jeweils 15 Minuten lang und in 60 °C heißer Waschlösung II 15 weitere Minuten gewaschen. Die noch feuchte Membran wurde in Zellophanfolie gewickelt und zur Exposition auf einen Röntgenfilm gelegt. Nach Exposition für 1-4 Tage bei -70 °C konnte der Film entwickelt werden.

Um den Blot erneut mit einer anderen Sonde hybridisieren zu können, wurde die Membran für 10 Minuten in kochender 0,1 % SDS-Lösung geschwenkt, kurz in 2 % SDS-Lösung gegeben und dann erneut prähybridisiert.

7.5 ELISA

ELISA steht für enzyme linked immuno sorbent assay. Diese Methode ermöglicht es, die Konzentration eines spezifischen Proteins zu messen. Hierzu wurde das DuoSet[®] ELISA Development System der Firma R&D verwendet, um im Überstand kultivierter Endothelzellen, die nach oben genanntem Schema stimuliert wurden, die Expression des Proteins MCP-1 zu messen.

Die Methode basiert darauf, dass eine 96 well-Platte zuerst mit einem Antikörper gegen das zu messende Protein (capture-Antikörper: 1 µg/ml, verdünnt in PBS) beschichtet und über Nacht inkubiert wurde. Mit Hilfe eines ELISA-washers wurde die Platte dreimal mit PBST gewaschen und pro well 300 µl Blockpuffer zugegeben. Während dieser eine Stunde lang inkubierte, wurden zur Erstellung einer Eichgerade Proteinstandards in absteigender Konzentration von 1000 pg/ml bis 10 pg/ml pipetiert. Als Verdünnungsmedium wurde Reagent Diluent verwendet. Nachdem die Platte nochmals gewaschen wurde, wurde in

Doppelansätzen 100 μl der Standards sowie der zu messenden Proben in die wells gegeben. An den capture-Antikörper band das zu messende Protein, in diesem Fall MCP-1 während der nächsten zwei Stunden. Nach einem weiteren Waschschrift wurden 100 μl eines zweiten Antikörpers (detection-Antikörper: 100 ng/ml verdünnt in Reagent Diluent) zugegeben, der in den folgenden zwei Stunden an ein anderes Epitop des Proteins band. Zu diesem Protein-Antikörper-Komplex wurde das Enzym Meerrettich-Peroxidase, was an Streptavidin gebunden ist, gegeben (100 μl pro well, 1:200 verdünnt in Reagent Diluent). Es band spezifisch an den detection-Antikörper. Durch dieses Enzym wurde nach 20 Minuten zugegebenes Substrat (100 μl , 1:1 H_2O_2 und Tetramethylbenzidin) in einen farbigen Komplex umgewandelt. Die Reaktion liess sich durch Zugabe von 50 μl 2N H_2SO_4 unterbrechen. Dieser Komplex wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einem computergestützten ELISA-reader gemessen.

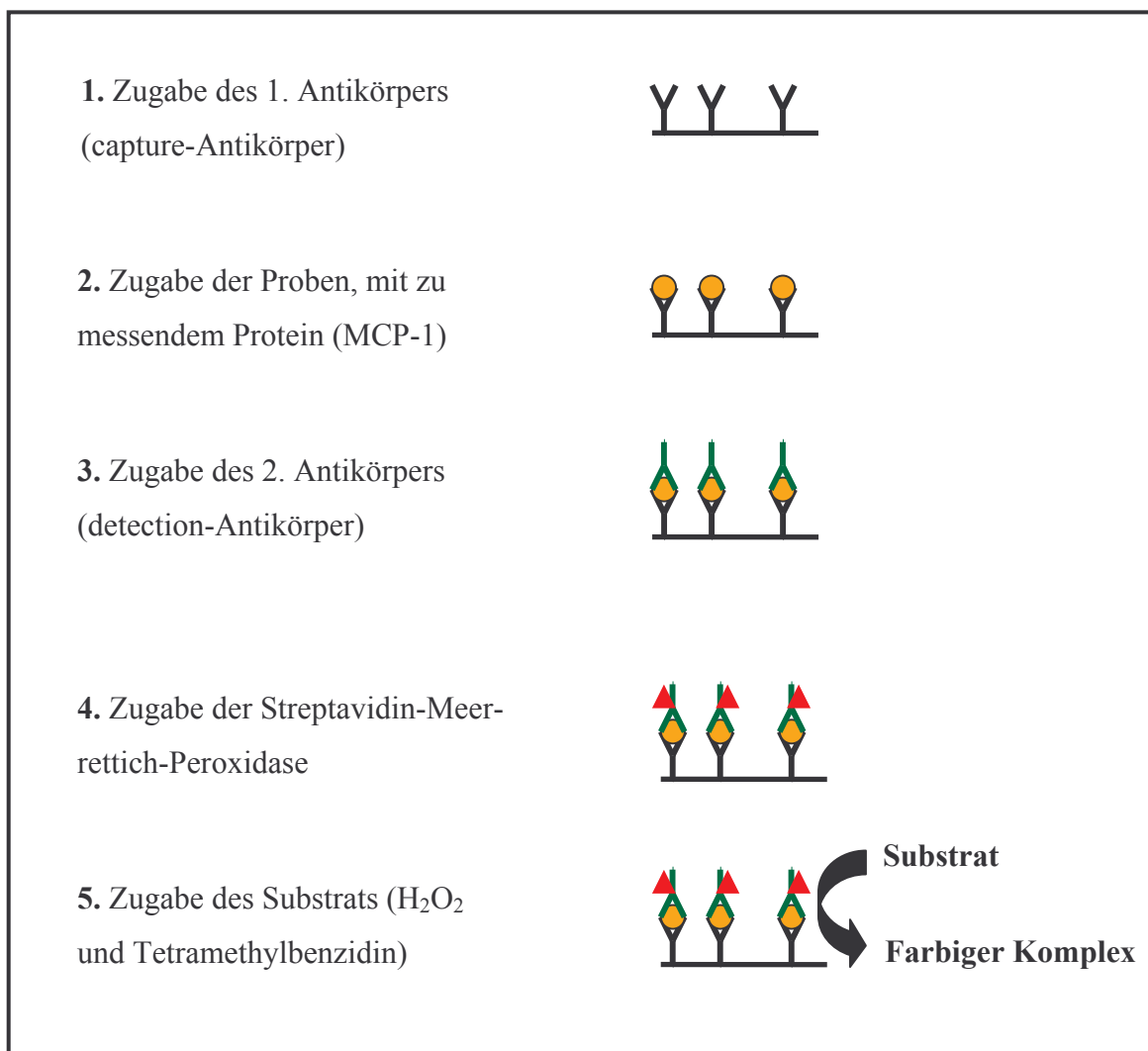


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Ablaufs eines ELISAs

Eine 96 well-Platte wird mit einem Antikörper gegen das zu messende Protein beschichtet und über Nacht inkubiert. An den capture-Antikörper bindet das zu messende Protein, in diesem Fall MCP-1. Dann wird ein

zweiter Antikörper (detection-Antikörper) zugegeben, der in den folgenden zwei Stunden an ein anderes Epitop des Proteins bindet. Zu diesem Protein-Antikörper-Komplex wird das Enzym Meerrettich-Peroxidase, was an Streptavidin gebunden ist, gegeben. Es bindet spezifisch an den detection-Antikörper. Durch dieses Enzym wird zugegebenes Substrat (H_2O_2 und Tetramethylbenzidin) in einen farbigen Komplex umgewandelt. (Abkürzungen: MCP-1: monocyte chemoattractant protein)

7.6 Statistik

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Microsoft Excel verarbeitet und als mean +/- standard error of the mean (SEM) dargestellt. Die Unterschiede wurden mittels ANOVA und Duncan's post-hoc-test untersucht. Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen.

8 ERGEBNISSE

8.1 PPAR γ -Aktivatoren reduzieren die AGE- und β -Amyloid-induzierte MCP-1- Proteinexpression in Endothelzellen

In humanen Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von RAGE die Expression proinflammatorischer Mediatoren, wie MCP-1 induziert. Da neueren Studien zu Folge PPAR γ -Aktivatoren die basale und TNF α -induzierte RAGE-Expression in Endothelzellen vermindern, wurde hier die funktionelle Relevanz dieser verminderten RAGE-Expression untersucht.

Hierzu wurden humane Endothelzellen mit Rosiglitazon und Pioglitazon 24 Stunden lang vorbehandelt und dann mit AGE-BSA (500 ng/ml) oder dem RAGE-Aktivator β -Amyloid (1 μ M) stimuliert und dann die MCP-1 Expression mittels ELISA im zellfreien Überstand gemessen. Die Stimulation von Endothelzellen mit AGE-BSA über 16 Stunden, induzierte die MCP-1-Expression von $13,3 \pm 9,3$ auf $1181,8 \pm 309$ ng/ml ($p < 0,05$; $n=5$).

Die Vorbehandlung der Zellen mit Rosiglitazon und Pioglitazon führte zu einer signifikanten Verminderung der AGE- induzierten MCP-1-Expression auf $192,5 \pm 108,8$ ng/ml beziehungsweise $130,8 \pm 60$ ng/ml ($p < 0,05$ für beide, verglichen mit AGE-stimulierten Zellen; $n=5$) (**Abbildung 4**).

Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Stimulation mit β -Amyloid erzielt. Allerdings ließ sich mit β -Amyloid ein geringer ausgeprägter Effekt auf die MCP-1-Protein-Expression erzielen. Aber auch hier führte die Vorbehandlung der Endothelzellen mit Thiazolidindionen zu einer signifikanten Verminderung der MCP-1-Protein-Expression (**Abbildung 5**).

Dagegen konnte auf die TNF α -induzierte MCP-1-Protein-Expression kein derartiger Effekt nachgewiesen werden. Somit konnte ein direkter Effekt der PPAR γ -Aktivatoren auf die MCP-1-Expression ausgeschlossen werden (**Abbildung 6**). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Verminderung der RAGE-Expression zu einer verminderten Ansprechbarkeit der Zellen auf proinflammatorische Reize, die über RAGE vermittelt werden, führt.

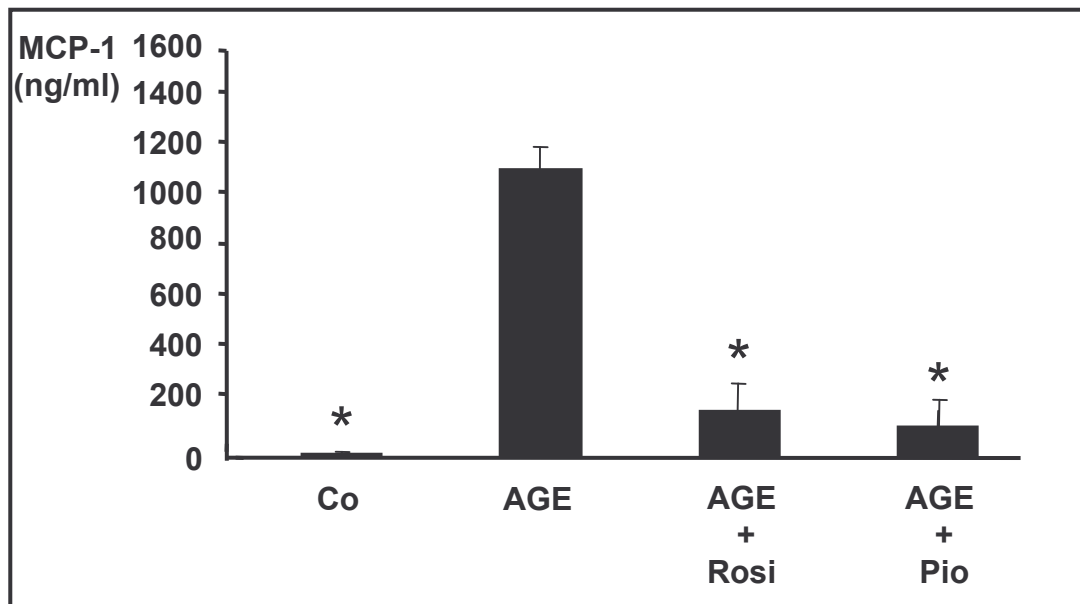


Abbildung 4: PPAR γ -vermittelte Effekte auf die AGE-induzierte MCP-1 Expression im ELISA

Die Säulen stellen den Mittelwert \pm Standardabweichung dar; * $p < 0,05$ verglichen mit AGE-stimulierten Zellen, berechnet aus fünf Experimenten. Die Stimulation von Endothelzellen mit AGE-BSA über 16 Stunden, induzierte die MCP-1-Expression von $13,3 \pm 9,3$ auf $1181,8 \pm 309$ ng/ml. Die 24-stündige Vorbehandlung der Zellen mit Rosiglitazon und Pioglitazon führte zu einer signifikanten Verminderung der AGE-induzierten MCP-1-Expression auf $192,5 \pm 108,8$ ng/ml beziehungsweise $130,8 \pm 60$ ng/ml. (Abkürzungen: MCP1: monocyte chemoattractant protein-1, Co: Negativkontrolle, AGE: advanced glycation endproducts, Rosi: Rosiglitazon, Pio: Pioglitazon)

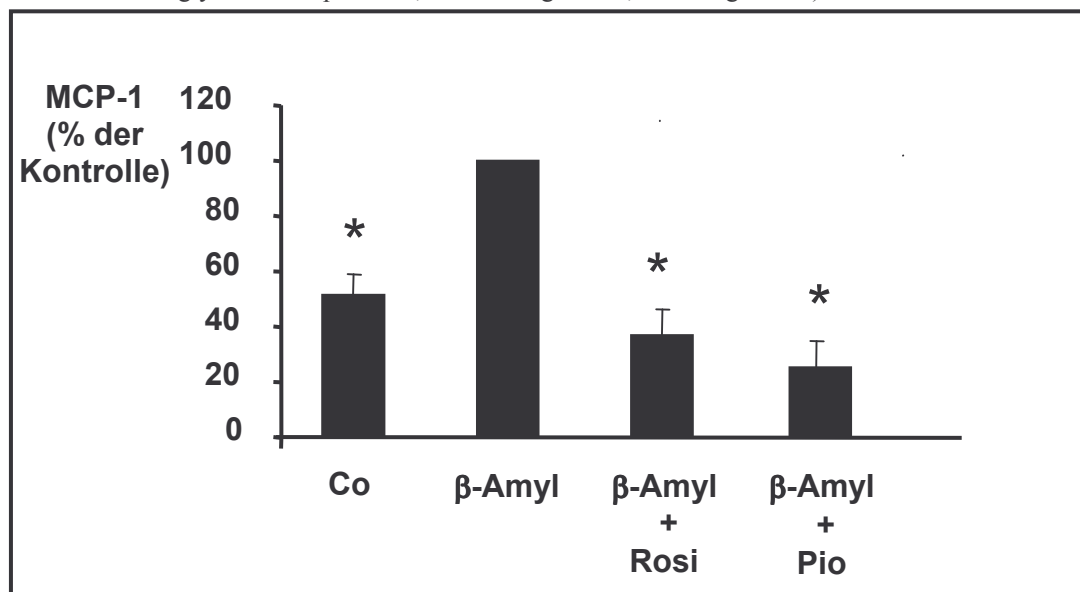


Abbildung 5: PPAR γ -vermittelte Effekte auf die β -Amyloid-induzierte MCP-1-Expression im ELISA

Die Ergebnisse sind als prozentualer Anteil der Kontrolle (β -Amyloid-stimulierte Zellen) dargestellt; * $p < 0,05$ verglichen mit β -Amyloid-stimulierten Zellen, berechnet aus fünf Experimenten. Die Vorbehandlung mit Rosiglitazon und Pioglitazon vermindern die β -Amyloid-induzierte MCP-1-Proteinsekretion signifikant auf 37% bzw. 25%. (Abkürzungen: MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1, Co: Negativkontrolle, β -Amyl: β -Amyloid, Rosi: Rosiglitazon, Pio: Pioglitazon)

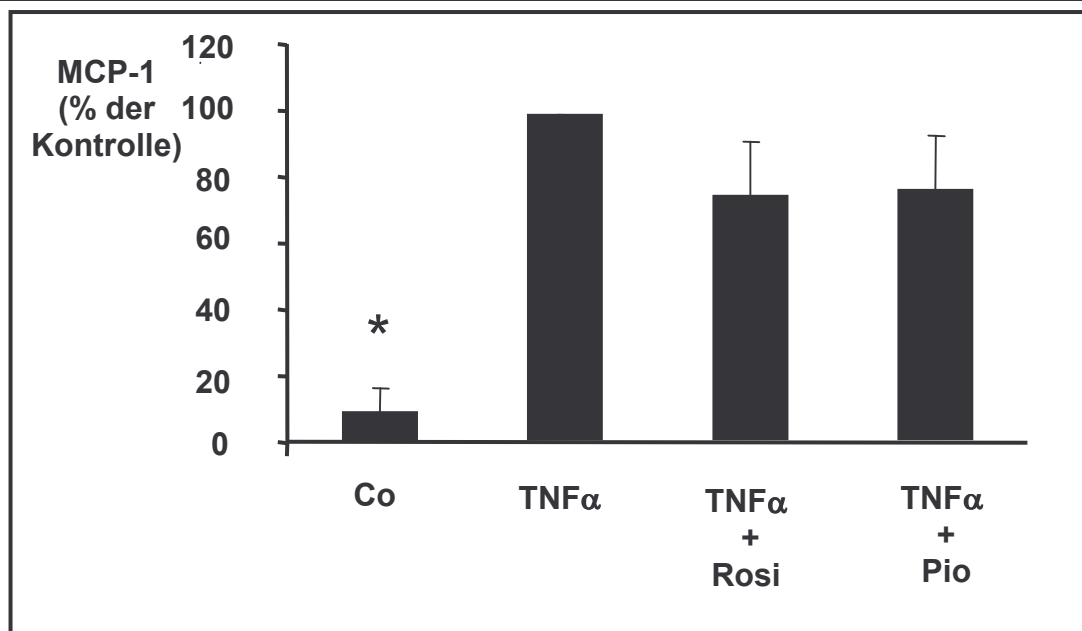


Abbildung 6: PPAR γ -vermittelte Effekte auf die TNF α -induzierte MCP-1-Expression im ELISA

Die Ergebnisse sind dargestellt als prozentualer Anteil der Kontrolle (TNF α -stimulierte Zellen);

$p < 0,05$ verglichen mit TNF α -stimulierten Zellen, berechnet aus fünf Experimenten. Die Vorstimulation mit Rosiglitazon und Pioglitazon vermindert die TNF α -induzierte MCP-1-Sekretion nicht signifikant.

(Abkürzungen: MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1, Co: Negativkontrolle, TNF α :

Tumornekrosefaktor α , Rosi: Rosiglitazon, Pio: Pioglitazon)

8.2 PPAR γ -Aktivatoren reduzieren die β -Amyloid-induzierte MCP-1 mRNA-Expression in Endothelzellen

Um zu untersuchen, ob diese im ELISA gemessenen Werte auf der verminderten mRNA-Expression beruhen, wurde die β -Amyloid induzierte mRNA-Expression des Chemokins MCP-1 bestimmt.

In drei unabhängigen Experimenten zeigten die PPAR γ -Aktivatoren Rosiglitazon und Pioglitazon eine deutliche Verminderung der β -Amyloid induzierten MCP-1-mRNA-Expression. Um einen direkten Effekt der PPAR γ -Aktivatoren auf die MCP-1-mRNA-Expression auszuschließen, wurden TNF α -stimulierte Zellen als Kontrolle verwendet. Bei diesen zeigten die PPAR γ -Aktivatoren keinen derartigen Effekt (**Abbildung 7**).

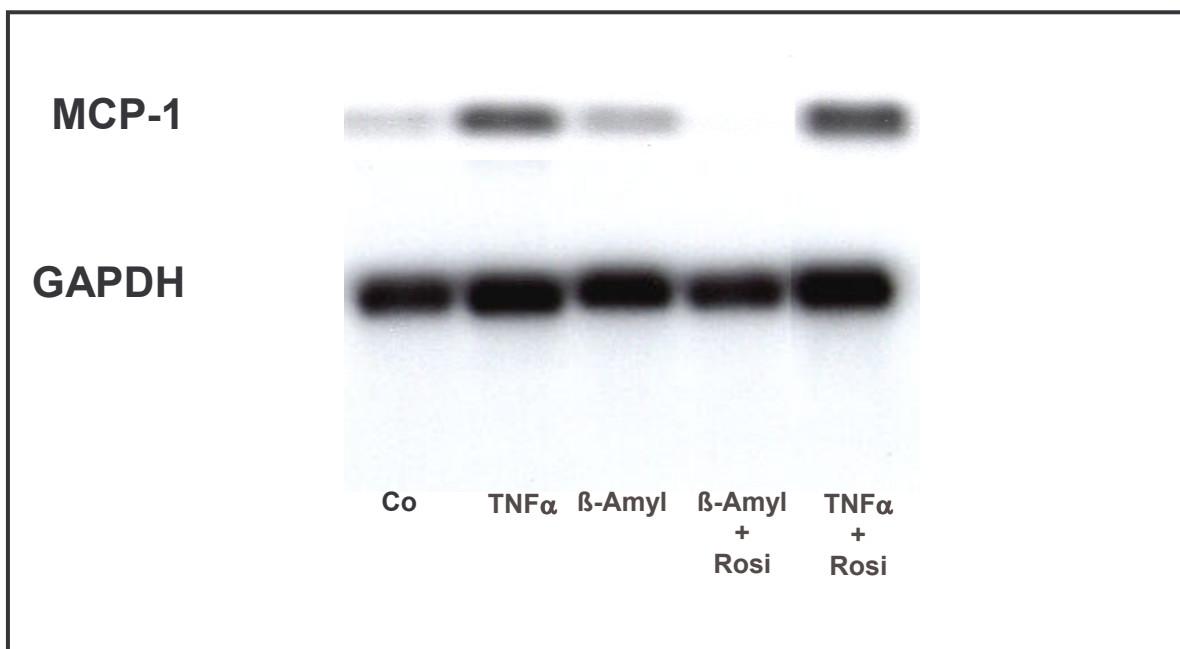


Abbildung 7: Northern Blot-Analyse der MCP-1-mRNA-Expression

Gezeigt ist hier ein repräsentativer Northern Blot von drei Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen. Die Vorstimulation mit Rosiglitazon vermindert die β -Amyloid-induzierte MCP-1 Expression deutlich. Dagegen reduziert es nicht die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte MCP-1-Expression. Um zu zeigen, dass gleiche Mengen RNA geladen wurden, wurde dieselbe Membran mit einer GAPDH-Sonde hybridisiert.

(MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1, GAPDH: Glyceral aldehyde phosphatase dehydrogenase, Co: Negativkontrolle, $\text{TNF}\alpha$: Tumornekrosefaktor α , β -Amyl: β -Amyloid, Rosi: Rosiglitazon)

8.3 PPAR γ -Aktivatoren reduzieren die β -Amyloid-induzierte VCAM-1-mRNA-Expression in humanen Endothelzellen

In drei unabhängigen Experimenten zeigten die Thiazolidindione Pioglitazon und Rosiglitazon eine deutliche Verminderung der β -Amyloid-induzierten mRNA-Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM-1. Auf die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte VCAM-1-Expression hatten die Thiazolidindione keinen derartigen Effekt. Somit konnte auch hier ein direkter Effekt der Thiazolidindione auf die VCAM-1-Expression ausgeschlossen werden (**Abbildung 8**).

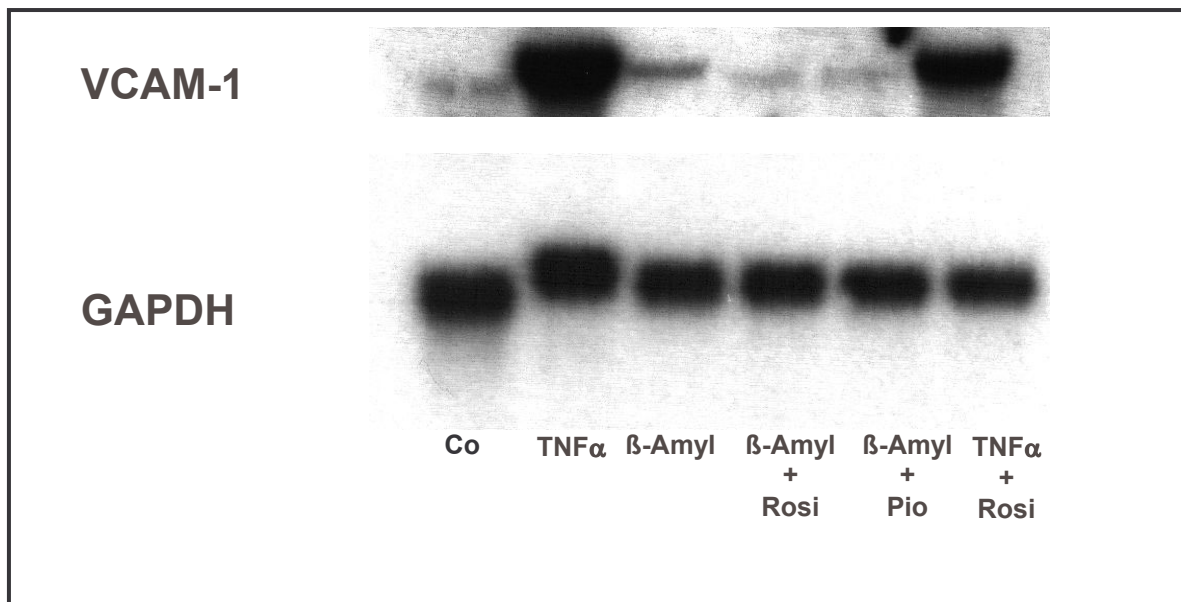


Abbildung 8: Northern Blot-Analyse der VCAM-1-mRNA-Expression

Gezeigt ist hier ein repräsentativer Northern Blot von drei Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen. Man erkennt deutlich, dass die Stimulation mit Rosiglitazon und Pioglitazon die β -Amyloid-induzierte VCAM-1-Expression vermindert. Die Vorstimulation mit Rosiglitazon und Pioglitazon vermindert nicht die TNF α -induzierte VCAM-1-Expression. Um zu zeigen, dass gleiche Mengen RNA geladen wurden, wurde dieselbe Membran mit einer GAPDH-Sonde hybridisiert.

(VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1, GAPDH: glyceral aldehyde phosphatase dehydrogenase, Co: Negativkontrolle, TNF α : Tumornekrosefaktor α , β -Amyl: β -Amyloid, Rosi: Rosiglitazon, Pio: Pioglitazon)

8.4 PPAR γ -Aktivatoren reduzieren die β -Amyloid-induzierte NF κ B-Aktivierung in Endothelzellen.

Um einen möglichen Effekt der PPAR γ -Aktivatoren auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B zu untersuchen, über den sowohl VCAM-1, als auch MCP-1 reguliert werden, wurden nach Stimulation der Zellen (\rightarrow 7.2) nukleäre Extrakte isoliert und Gelshiftanalysen durchgeführt. Als Sonde kamen Oligonukleotide, die zu der NF κ B-Konsensus-Sequenz (Ig κ : 5'-CTA GTC TCA ACA GAG GGG ACT TTC CGA GAG GCC AT-3') korrespondieren, zum Einsatz. Hier zeigte sich analog zu den Ergebnissen auf mRNA-Ebene, dass Rosiglitazon und Pioglitazon die β -Amyloid induzierte NF κ B-Aktivierung signifikant reduzieren. Keine dieser beiden Substanzen zeigte einen Effekt auf die TNF α -induzierte NF κ B-Aktivierung (**Abbildung 9**).

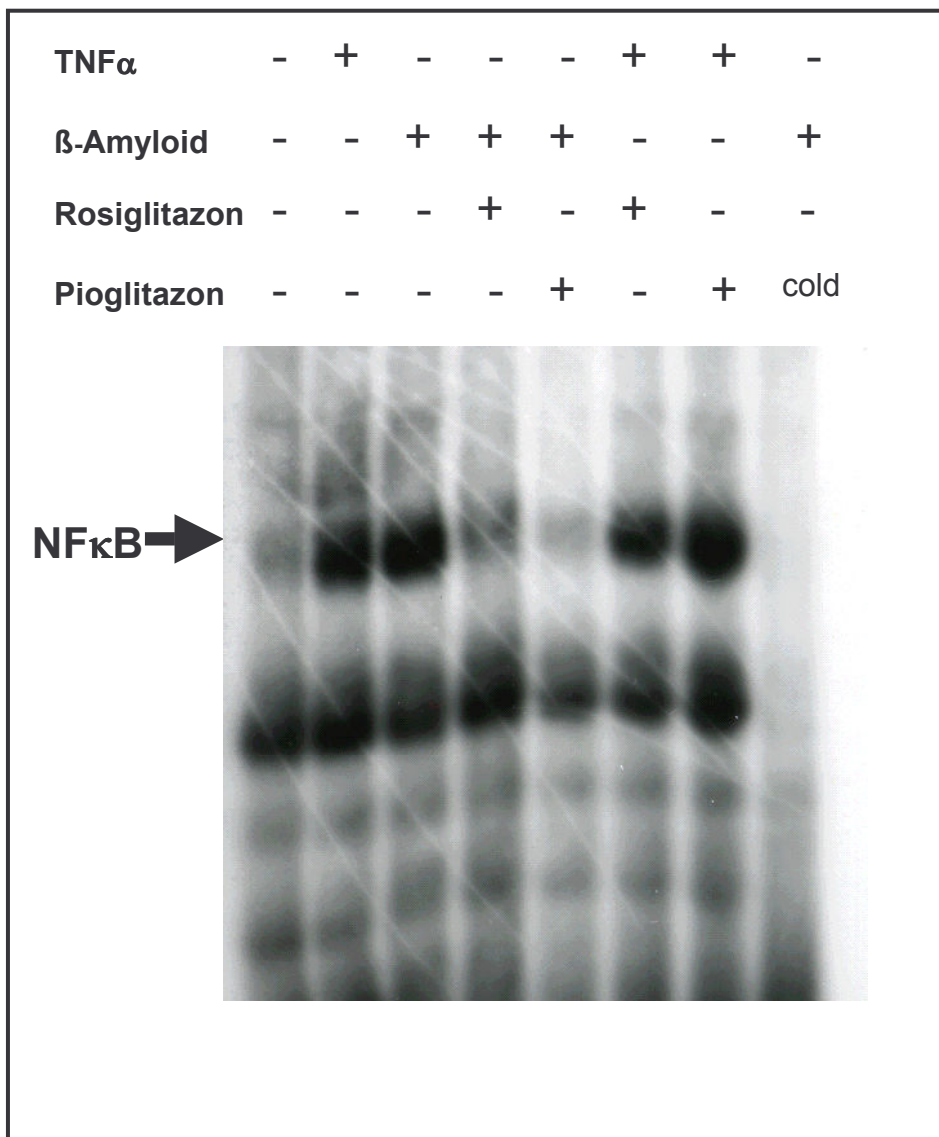


Abbildung 9: Gelshiftanalyse mit Oligonukleotiden, die zur NF κ B-Konsensussequenz Ig κ korrespondieren. Hier gezeigt ist eine repräsentative Gelshiftanalyse von drei Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen. Die Banden zeigen an, wo eine Bindung des Transkriptionsfaktors NF κ B an DNA stattgefunden hat. Die Vorstimulation mit Rosiglitazon und Pioglitazon vermindert die β -Amyloid-induzierte NF κ B-Aktivierung, wohingegen die TNF α -induzierte NF κ B-Aktivierung nicht reduziert wird. Die Spezifität der Bindung wurde mit nicht markiertem Oligonukleotid in hohem Überschuss geprüft. Dies sollte durch Konkurrenz eine Abschwächung oder das Verschwinden der Bande bewirken, welche die DNA-Proteinbindung anzeigt. (Abkürzungen: TNF α : Tumornekrosefaktor α , cold: nicht radioaktiv- markierte Oligonukleotide in hohem Überschuss, NF κ B: nuclear Factor κ B)

9 DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass die PPAR γ -Aktivatoren Rosiglitazon und Pioglitazon die AGE- und β -Amyloid-induzierte Expression des proinflammatorischen Chemokins MCP-1 und des Adhäsionsmoleküls VCAM-1 in humanen Endothelzellen vermindern. Dies scheint über eine verminderte Expression von RAGE und der daraus resultierenden reduzierten Ansprechbarkeit der Zellen auf RAGE-Aktivatoren vermittelt zu werden. Somit konnte diese Arbeit einen neuen Regulationsmechanismus der MCP-1- und VCAM-1-Expression aufzeigen, sowie einen Beitrag zum Verständnis der funktionellen Bedeutung der PPAR γ -vermittelten Inhibition der RAGE-Expression leisten.

Verminderung proinflammatorischer AGE-Effekte in humanen Endothelzellen, über PPAR γ -vermittelte Reduktion der endothelialen RAGE-Expression

In dieser Arbeit konnte mittels ELISA in zellfreien Überständen von humanen Endothelzellen gezeigt werden, dass PPAR γ -Aktivatoren die β -Amyloid und AGE-induzierte MCP-1-Expression vermindern. Dagegen bleibt die TNF α -induzierte MCP-1-Expression unbeeinflusst. Dieses Phänomen scheint nicht auf posttranskriptioneller Regulation oder verminderter RNA-Stabilität zu beruhen, da sich in den Northern-Blot-Analysen zeigte, dass dieses Ergebnis tatsächlich auf verminderter mRNA-Produktion beruht.

Für VCAM-1 zeigte sich auf mRNA-Ebene ein ähnliches Ergebnis. Auch die β -Amyloid und AGE-induzierte VCAM-1-Expression wird durch die genannten PPAR γ -Aktivatoren reduziert, jedoch nicht die TNF α -induzierte VCAM-1-Expression. Um den Regulationsmechanismus auf transkriptioneller Ebene zu charakterisieren, wurden Gelshiftanalysen durchgeführt, welche ergaben, dass den beobachteten Effekten eine verminderte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B zu Grunde liegt.

In Endothelzellen führt die RAGE-Stimulation zur Steigerung der basalen RAGE-Expression und gleichzeitig über die Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade zu gesteigerter MCP-1- und VCAM-1-Expression. Die Stimulation der Zellen mit PPAR γ -Aktivatoren führt zur verminderten RAGE-Expression und so zur verminderten Ansprechbarkeit der Zellen für AGE-Aktivatoren und folglich zur Reduktion der MCP-1- und VCAM-1-Expression. Die TNF α -induzierte MCP-1- und VCAM-1 Expression lässt sich nicht auf diese Weise vermindern, da sie direkt über NF κ B vermittelt wird. Somit kann ein direkter Effekt der PPAR γ -Aktivatoren auf die MCP-1- und VCAM-1-Expression

ausgeschlossen werden. Diese Daten stehen im Einklang zu vorherigen Ergebnissen, die einen direkten Effekt der PPAR γ -Aktivatoren auf MCP-1 und VCAM-1 ausschlossen [48]. Demnach beruht die verminderte MCP-1- und VCAM-1-Expression nach heutigem Kenntnisstand allein auf der verminderten Ansprechbarkeit der Zelle auf AGE-Aktivatoren.

PPAR γ -vermittelte Effekte auf die Atherogenese

PPAR γ , ursprünglich charakterisiert als Transkriptionsfaktor, welcher die Genexpression in der Adipogenese und Glukosehomöostase reguliert, konnte in den letzten Jahren als ein wichtiges Regulationselement in der Atherogenese identifiziert werden. PPAR γ wird von Endothelzellen, T-Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen und glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert, wobei für den Grad der Expression in letzteren widersprüchliche Daten existieren [47, 46]. Verschiedene Arbeiten der letzten Jahre konnten demonstrieren, dass PPAR γ -Aktivatoren die Migration von glatten Gefäßmuskelzellen [37, 23, 24] und die Expression matrixdegradierender Enzyme wie MMP-9 hemmen können [50]. Gleichzeitig fördern sie die Stickstoffmonoxid-Bildung in glatten Gefäßmuskelzellen [28] und hemmen die Expression des Angiotensin-II-Rezeptors [80].

Weiterhin können auch in Endothelzellen verschiedene antiinflammatorische Effekte nachgewiesen werden. PPAR γ -Agonisten hemmen zum einen die Bildung der Wachstumsfaktoren VEGF-1 und VEGF-2, welche die Angiogenese fördern [87], zum anderen auch die Expression verschiedener Chemokine wie IP-10, MIG und I-TAC [48] und leukozytärer Adhäsionsmoleküle wie VCAM-1, ICAM-1 und E-Selektin [58]. Funktionell betrachtet, führt dies zur verminderten Einwanderung inflammatorischer Zellen in die Gefäßwand und zu verlangsamter Plaqueprogression.

Die funktionelle Relevanz diese Befunde zeigt sich im T-Zell-Migrationsassay, in dem die PPAR γ -Stimulation die chemotaktische Aktivität im Überstand von Endothelzellen reduziert [48]. Die Sekretion von Zytokinen läßt sich in vitro sowohl in T-Lymphozyten als auch in monozytären Zellen durch PPAR γ -Aktivierung hemmen [46, 32]. Ricote et al. konnten zeigen, dass sich in Monozyten/Makrophagen die Produktion von iNOS, Scavengerrezeptor A und Gelatinase A durch PPAR γ -Agonisten vermindern lässt. Hierfür scheint weder die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor NF κ B, noch mit AP-1 oder STAT-1 verantwortlich zu sein, sondern ein noch nicht näher charakterisierter Mechanismus [62].

Im Gegensatz zu diesen antiatherogenen Wirkungen stehen kontroverse Befunde bezüglich der PAI-1-Expression, einem wichtigen Fibrinolyseinhibitor in Endothelzellen. Während die natürlichen PPAR γ -Liganden seine Expression erhöhen, haben die Thiazolidindione keinen derartigen Effekt, und weitere Arbeiten sind erforderlich, um diese Befunde zu klären [47]. Auch in Monozyten und Makrophagen weisen einige Studien auf potentiell proatherogene Mechanismen neben den bereits genannten antiinflammatorischen Effekten hin. So führt die Bindung von oxidierten LDL an PPAR γ zur gesteigerten Bildung des Scavengerrezeptors CD 36, der für die Aufnahme von LDL und die Differenzierung zur Schaumzelle verantwortlich ist [85]. Einige Studien deuten bereits darauf hin, dass Kompensationsmechanismen für diesen Effekt existieren. Neben der Induktion von CD 36, werden ein anderer Scavengerrezeptor (SR-A) vermindert exprimiert [54] und die Expression eines Cholesteroltransporters (ABCA1), der zum Cholesteroltransfer aus der Zelle beiträgt, induziert [14].

Nach der jetzigen Datenlage, auch wenn wenig in vivo Daten und nur kleine klinische Studien existieren, scheint der Gesamteffekt einer PPAR γ -Aktivierung günstig zu sein und die Arterioskleroseentstehung zu verlangsamen.

Neuere Daten konnten in Endothelzellen eine durch PPAR γ -Aktivatoren reduzierte Expression von RAGE-mRNA und Protein zeigen [52]. Der hier beobachtete Effekt beruht ebenso wie viele der genannten Wirkungen wahrscheinlich auf einer PPAR γ -Aktivierung, da Rosiglitazon und Pioglitazon gut charakterisierte PPAR γ -Aktivatoren mit sehr geringer Aktivierung von PPAR α sind. Arbeiten der letzten Zeit konnten jedoch zeigen, dass einige der Glitazonwirkungen in monozytären Zellen nicht über PPAR γ vermittelt werden, da die inhibitorischen Effekte auf die Zytokinproduktion unabhängig von diesem Transkriptionsfaktor auftraten [12]. Auch wenn Endothelzellen sich von Monozyten/Makrophagen in ihrer Signalantwort grundlegend unterscheiden, kann auch hier nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Effekte der verminderten RAGE-Expression unabhängig von PPAR γ sind.

Neben den bereit bekannten potentiell atheroprotektiven Effekten konnte die vorliegende Arbeit einen neuen Mechanismus aufzeigen, wie PPAR γ -Aktivatoren über eine Verminderung der RAGE-Expression die Expression zweier Mediatoren in der frühen Atherogenese beeinflussen können.

Funktionelle Relevanz:**Verminderte AGE/RAGE-Interaktion**

Bei Diabetikern stellen nichtenzymatisch glykierte Endprodukte, sogenannte advanced glycation endproducts (AGEs) einen entscheidenden Stimulus der inflammatorischen Reaktion in vaskulären Zellen dar [69]. Bei diesen Patienten konnte die Ablagerung von AGEs in einer Vielzahl von Geweben, wie in der Gefäßwand, Haut und Makrophagen in höherem Maße als beim Gesunden nachgewiesen werden [74, 65].

Die abgelagerten AGEs fördern über verschiedene Mechanismen die Entstehung arteriosklerotischer Läsionen. Neben Veränderungen des Gerinnungssystems, wie gesteigerter Thrombozytenaggregation, induzieren sie die Entstehung freier Radikale und die Verminderung der Konzentration an vasodilatatorischem Stickstoffmonoxid, wodurch oxidativer Stress entsteht. Unter diesen Bedingungen kann es zur Verdickung der Gefäßwand, folglich zu Elastizitätsverlust und endothelialer Dysfunktion kommen. Subendotheliale Strukturproteine wie Kollagen oder Laminin werden durch die Bildung von Quervernetzungen (cross-links) verändert, was zu einer gesteigerten vaskulären Permeabilität und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen führt und so die Arterioskleroseentstehung erleichtert [74].

Die Aktivierung von RAGE führt über einen Signalweg, der p21^{ras}, die Phosphatidylinositol-3 Kinase und Mitogen-Aktivierte-Protein-(MAP)-Kinasen einschließt, zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB [79] und so zur Induktion der Expression von Genen führen, die für proinflammatorische und prokoagulatorische Proteine wie MCP-1, VCAM-1, M-CSF, Endothelin-1, TNFα oder Gewebsthromboplastin kodieren [66, 15, 67, 69].

Endothelzellen zeigen eine basale RAGE-Expression, die durch Stimulation der Zellen mit proatherogenen Substanzen wie AGEs, TNFα oder β-Östradiol verstärkt werden kann. Diese Expressionsinduktion wird auf transkriptioneller Ebene durch Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFκB bei AGEs und TNFα, bzw. SP-1 bei β-Östradiol vermittelt [82]. Nach gegenwärtigem Konzept verstärkt die Interaktion von RAGE mit den genannten Liganden die Rezeptorexpression und initiiert so eine sich selbst verstärkende Spirale der Zellaktivierung [41]. Die Hemmung der RAGE-Synthese durch Transfektion von RAGE-Antisense-Oligonukleotiden oder Blockierung der AGE-Rezeptoren mit neutralisierenden Antikörpern führt zur Inhibition der AGE-vermittelten vaskulären Hyperpermeabilität und endothelialen Dysfunktion [89, 5]. Tierexperimentelle Daten konnten zeigen, dass eine

Hemmung der AGE-RAGE-Interaktion zu einer deutlichen Verminderung der Arteriosklerose im atherogenen Mausmodell führt [57].

Eine Reduktion der RAGE-Expression durch PPAR γ -Aktivatoren vermindert die Ansprechbarkeit der Zellen auf proinflammatorische Reize, die durch AGEs und andere RAGE-Aktivatoren wie β -Amyloid vermittelt werden. Unter der Annahme, dass in den Gefäßen diabetischer Patienten große Mengen an RAGE exprimiert werden und auch erhöhte Spiegel an zirkulierenden AGEs vorliegen, findet eine dauerhafte Stimulation der Endothelzellen statt, die so ständig proatherogene Mediatoren wie MCP-1 und VCAM-1 exprimieren, welche so die Entzündungsantwort in der Gefäßwand verstärken. Die PPAR γ -Aktivatoren bieten so für den diabetischen Hochrisikopatienten eine neue Therapieoption, die ermöglichen könnte, die RAGE-vermittelte Zellaktivierung in der arteriosklerotischen Läsion zu limitieren.

Verminderte MCP-1 und VCAM-1-Expression

Die funktionelle Relevanz einer verminderten RAGE-Expression zeigt sich in der reduzierten β -Amyloid induzierten MCP1- und VCAM-1-Expression.

In den letzten Jahren hat das Chemokin MCP-1 ein wachsendes Interesse in der Arterioskleroseforschung geweckt, da es die frühen Schritte in der Atherogenese maßgeblich zu beeinflussen scheint. Seine Hauptwirkung besteht in der chemotaktischen Wirkung auf Monozyten/Makrophagen, T-Lymphozyten und basophile Granulozyten. In Endothelzellen trägt die MCP-1-Bildung entscheidend dazu bei, dass ein Chemokingradient zwischen Gefäßlumen und dem subendothelialen Raum entsteht und so Entzündungszellen angezogen werden, was einer der ersten Schritte in der Atherogenese ist. Durch den Nachweis der Expression von MCP-1-mRNA in arteriosklerotischen Läsionen [81] konnte dieses Chemokin mit der Pathogenese der Arteriosklerose in Verbindung gebracht werden.

Auch die Extravasation, Adhäsion und Phagozytose von Makrophagen werden durch MCP-1 reguliert. In vitro Daten zeigen, dass MCP-1 zusammen mit IL-8 die feste Bindung von rollenden Monozyten an Integrine induziert und so erst die Einwanderung in das subintimale Gewebe ermöglicht [45].

In verschiedenen Arbeiten mit dyslipämischen Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass durch die Deletion des MCP-1-Gens das Fortschreiten der Arteriosklerose vermindert werden konnte. Gu et al. konnten zeigen, dass LDL-Rezeptor-defiziente Mäuse, welche aufgrund dieses Stoffwechseldefektes sehr schnell Arteriosklerose entwickeln, nach

Deletion des MCP-1-Gens unter cholesterinreicher Kost deutlich weniger Lipidablagerungen und eingewanderte Makrophagen aufwies als die Kontrollgruppe [26]. Auch in Untersuchungen in Apolipoprotein-E-defizienten Mäusen, denen Knochenmarkszellen, die das MCP-1-Gen überexprimierten, implantiert wurden, fanden sich vermehrt Makrophagen und oxidierte Lipide [1]. Die gleiche Arbeitsgruppe untersuchte in Mäusen, die Apolipoprotein B überexprimieren, die Folgen der Deletion des MCP-1-Gens. Diese Tiere waren trotz ihrer deutlichen Lipoproteinüberproduktion und eigentlich so gesteigerten Anfälligkeit für Arteriosklerose auch nach einer fettreichen Diät vor der Schaumzell- und Läsionsbildung geschützt [25].

In Untersuchungen mit Mäusen, denen der MCP-1-Rezeptor (CCR2) fehlte, zeigten sich Veränderungen in der Monozytenrekrutierung, Chemokinexpression und Immunantwort [36, 8].

VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) ist ein Adhäsionsmolekül der Immunglobulin-Superfamilie, dem eine zentrale Rolle bei der Adhäsion von mononukleären Zellen, wie Monozyten und T-Lymphozyten auf Endothelzellen zukommt [56]. VCAM-1 interagiert mit VLA-4, einem $\alpha 4\beta 1$ -Integrin, welches konstitutiv von Monozyten und Lymphozyten exprimiert wird und bewirkt hierüber die Anheftung dieser Zellen. Sodann vermittelt es die Öffnung der endothelialen Zellkontakte und ermöglicht so Leukozyten die Einwanderung in die Subintima [42].

Neben Endothelzellen, können glatte Gefäßmuskelzellen, Makrophagen, Fibroblasten und andere nichtendotheliale Zellen VCAM-1 exprimieren [56]. Die VCAM-1-Expression kann durch verschiedene proatherogene Faktoren, wie Hypercholesterinämie, AGEs, oxidierte LDLs und verschiedene Zytokine wie IL-1 und TNF α induziert werden. Verschiedene Antioxidantien wie Vitamin E oder Probucol können die Expression in vivo und in vitro vermindern [19].

Ebenso wie MCP-1 wird die VCAM-1-Expression über den Transkriptionsfaktor NF κ B reguliert.

Frühere Studien konnten eine endotheliale VCAM-1-Expression in frühen arteriosklerotischen Läsionen in Arterien von ApoE-defizienten Mäusen und von Kaninchen, welche mit cholesterinreicher Diät gefüttert wurden, zeigen [40, 31]. Auch in humanen fortgeschrittenen arteriosklerotischen Läsionen konnte VCAM-1 nachgewiesen werden, besonders auf glatten Gefäßmuskelzellen und Makrophagen in tieferen subendothelialen Schichten, nahe der Lamina elastica interna. Dies führte zu der Annahme,

dass die Entzündungszellen nicht nur vom arteriellen Lumen, sondern auch von den vasa vasorum und der hiervon ausgehenden Neovaskularisation einwandern [56].

Da Monozyten mit 80% den größten Teil an leukozytären Zellen in einer arteriosklerotischen Läsion ausmachen, kommt VCAM-1 und MCP-1, welche maßgeblich deren Rekrutierung in den subendothelialen Raum steuern, eine große Bedeutung für frühe Schritte der Atherogenese zu.

Vor diesem Hintergrund scheint die Beeinflussung der MCP-1- und VCAM-1-Expression ein zentraler Ansatzpunkt in der Prophylaxe der Arteriosklerose zu sein. Mit den Thiazolidindionen besteht offenbar die Möglichkeit, die beim Diabetiker bedeutsame AGE-induzierte MCP-1- und VCAM-1-Expression über eine Verminderung der RAGE-Expression zu reduzieren und so gerade diesem Risikopatienten eine neue Therapieoption zu bieten. Neuere klinische Studien zeigen bereits einen positiven Effekt einer Thiazolidindion-Behandlung auf Arteriosklerosemarker bei diabetischen Patienten [27, 53]. Allerdings werden weitere Studien nötig sein, um zu beurteilen, welchen Beitrag hierzu die hier beschriebene verminderte endotheliale RAGE-Expression leistet.

Schlussfolgerung:

Da bekannterweise die Aktivierung von RAGE einen entscheidenden Schritt in der Atherogenese vor allem beim diabetischen Patienten darstellt, sollte in dieser Arbeit, die funktionelle Relevanz einer PPAR γ -vermittelten Reduktion der RAGE-Expression untersucht werden. Die Arbeit konnte zeigen, dass die PPAR γ -Aktivatoren Rosiglitazon und Pioglitazon in humanen Endothelzellen die AGE-induzierte MCP-1- und VCAM-1-Expression vermindern. Dies beruht auf der PPAR γ -induzierten verminderten RAGE-Expression, welche zur verminderten Ansprechbarkeit der Endothelzellen auf AGE-Aktivatoren führt. Somit konnte zum einen ein neuer Regulationsmechanismus der MCP-1- und VCAM-1-Expression, zum anderen ein neuer PPAR γ -vermittelter Effekt, der potentiell atheroprotektiv ist, aufgezeigt werden. Diese Ergebnisse könnten eine wichtige klinische Bedeutung haben, da gerade beim diabetischen Hochrisikopatienten hohe Spiegel an AGEs und RAGEs vorliegen, und es so zu einer andauernden Sekretion proinflammatorischer Mediatoren wie zum Beispiel von MCP-1 und VCAM-1 kommt.

Hierdurch wird die Entstehung arteriosklerotischer Läsionen gefördert, indem die Einwanderung und Aktivierung von Leukozyten in die Gefäßwand erleichtert wird. Diese setzen Mediatoren, wie TNF α frei, was wiederum zur gesteigerten endothelialen RAGE-

Expression und so zur Entstehung eines Teufelskreises führt, der die Atherogenese beim Diabetiker stetig vorantreibt. Vor dem Hintergrund, dass die Unterbrechung der AGE-RAGE-Interaktion im Tiermodell zur Reduktion der Größe arteriosklerotischer Läsionen führte, stellt die Verminderung der RAGE-Expression durch die Thiazolidindione eine neue therapeutische Option dar, beim diabetischen Patienten den atherogenen Prozess zu verlangsamen.

10 ZUSAMMENFASSUNG

Nichtenzymatisch-glykierte Endprodukte, sogenannte advanced glycation end products stellen bei Diabetikern einen entscheidenden Stimulus für die Entstehung arteriosklerotischer Gefäßveränderungen dar. AGEs¹ fördern über spezifische Rezeptoren (RAGE²s) auf vaskulären Zellen den Prozess der Atherogenese.

Neben AGEs können auch β -Amyloid und andere Substanzen an RAGE binden und über Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B³ die Expression proinflammatorischer Mediatoren, wie MCP-1⁴ und VCAM-1⁹ induzieren.

Das Chemokin MCP-1 und das leukozytäre Adhäsionsmolekül VCAM-1 beeinflussen die frühen Schritte der Atherogenese durch Rekrutierung von Leukozyten in die Gefäßwand maßgeblich.

Vor dem Hintergrund, dass im Tierexperiment die Unterbrechung der AGE-RAGE-Interaktion zu einer signifikanten Verminderung der Größe arteriosklerotischer Läsionen führt, könnte die Reduktion der RAGE-Expression in vaskulären Zellen, gerade bei Diabetikern ein neues Konzept zur Beeinflussung der Atherogenese darstellen.

PPAR γ ⁵ ist ein in Endothelzellen und anderen vaskulären Zellen neu beschriebener nukleärer Transkriptionsfaktor, der durch, die bereits klinisch angewendeten Thiazolidindione, Rosiglitazon und Pioglitazon, aktiviert wird und auf verschiedenen Ebenen die Arterioskleroseentstehung zu vermindern scheint. Da neuere Studien zeigen, dass sich die basale und die TNF α ⁶-induzierte RAGE-Expression durch PPAR γ -Aktivatoren vermindern läßt, sollte die vorliegende Arbeit die funktionelle Relevanz dieser verminderten RAGE-Expression untersuchen.

Hierzu untersuchte diese Arbeit den Einfluss der PPAR γ -Aktivatoren Rosiglitazon und Pioglitazon auf die AGE- und β -Amyloid-induzierte MCP-1- und VCAM-1-Expression, von welchen bekannt ist, dass ihre Expression nicht direkt von PPAR γ -Aktivatoren beeinflusst werden, auf drei Ebenen.

Im ELISA⁷ zeigte sich, dass die Vorbehandlung humaner Endothelzellen mit Rosiglitazon und Pioglitazon die AGE- und β -Amyloid-induzierte MCP-1-Proteinexpression signifikant vermindert. Diese verminderte Proteinexpression beruht auf verminderter mRNA⁸-Expression, wie im Northern Blot gezeigt werden konnte. Ebenfalls in Northern Blot-Analysen zeigte sich, dass PPAR γ -Aktivatoren die AGE- und β -Amyloid-induzierte VCAM-1-mRNA-Expression reduzieren. Gelshiftanalysen zeigten, dass dies über eine

verminderte NF κ B-Aktivierung reguliert wird. Da auf die TNF α -induzierte MCP-1- und VCAM-1-Expression kein derartiger Effekt nachgewiesen werden konnte, lassen diese Ergebnisse vermuten, dass die PPAR γ -Aktivatoren über eine Verminderung der RAGE-Expression zu einer reduzierten Ansprechbarkeit der Zellen auf proinflammatorische Reize führen, und kein direkter Effekt auf die MCP-1-Expression vorliegt.

Diese Ergebnisse könnten eine wichtige klinische Bedeutung haben, da gerade beim diabetischen Hochrisikopatienten hohe Spiegel an AGEs und RAGEs vorliegen, und es so zu einer andauernden Sekretion proinflammatorischer Mediatoren wie zum Beispiel von MCP-1 und VCAM-1 kommt. Dadurch wird die Entstehung arteriosklerotischer Läsionen wesentlich gefördert, indem die Einwanderung und Aktivierung von Leukozyten in die Gefäßwand erleichtert wird. Diese setzen Mediatoren, wie TNF α frei, was wiederum zur gesteigerten endothelialen RAGE-Expression und so zur Entstehung eines Teufelskreises führt, der den Prozess der Arterioskleroseentstehung beim Diabetiker stetig vorantreibt.

Mit den Thiazolidindionen besteht offenbar die Möglichkeit, die beim Diabetiker bedeutsame AGE-induzierte MCP-1- und VCAM-1-Expression über eine Verminderung der RAGE-Expression zu reduzieren und so gerade diesem Risikopatienten eine neue Therapieoption zu bieten.

¹advanced glycation endproduct

²receptor for advanced glycation endproducts

³nuclear factor kappa B

⁴monocyte chemoattractant protein-1

⁵peroxisome proliferator-activated receptor gamma

⁶Tumornekrosefaktor alpha

⁷Enzyme linked immunosorbent assay

⁸messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)

⁹vascular cell adhesion molecule-1

11 LITERATURVERZEICHNIS

1. Aiello RJ, Bourassa SL, Weng W, Natoli E, Rollins BJ, Milos PM: Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arteriosclerosis*; **19**: 1518-1525 (1999)
2. Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P: Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb*; **11**: 1223-1230 (1991)
3. Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Frering V, Riou JP, Staels B, Auwerx J, Laville M, Vidal H: Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alterations in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes*; **46**: 1319-1327 (1997)
4. Beller GA: Coronary Heart Disease in the First 30 Years of the 21st century: Challenges and opportunities. *Circulation*; **103**: 2428- 2435 (2001)
5. Bierhaus A, Chevion S, Chevion M, Hofmann M, Quehenberger P, Illmer T, Luther T, Berentshtein E, Tritschler H, Muller M, Wahl P, Ziegler R, Nawroth PP: Advanced glycation end product-induced activation of NF-kappaB is suppressed by alpha-lipoic acid in cultured endothelial cells. *Diabetes*; **46**: 1481-1490 (1997)
6. 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)
7. Bierman EL: George Lyman Duff Memorial Lecture. Atherogenesis in diabetes. *Arterioscler Thromb*; **12**: 647-656 (1992)
8. Boring L, Gosling J, Chensue SW, Kunkel SL, Farese RV Jr, Broxmeyer HE, Charao IF: Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *J Clin Invest*; **100**: 2552-2561 (1997)
9. Bourcier T, Sukhova GK, Libby P: The nuclear factor- κ B signalling pathway participates in dysregulation of vascular smooth muscle cells in vitro and in human atherosclerosis. *J Biol Chem*; **272**: 15817-15824 (1997)
10. Brett J, Schmidt AM, Yan SD, Zou YS, Weidman E, Pinsky D, Nowygrad R, Nepper M, Przysiecki C, Shaw A, Migheli A, Stern D: Survey of the distribution of a newly

- characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *Am J Pathol*; **143**: 1699-1712 (1993)
11. Brownlee M: Advanced protein glycosilation in diabetes and aging. *Annu Rev Med*; **46**: 223-234 (1995)
 12. Chawla A, Barak Y, Nagy L, Liao D, Tontonoz P, Evans RM: PPAR- γ dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat Med*; **7**: 48-52 (2001)
 13. Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Torra IP, Delerive P, Majd Z, Fruchart JC, Chapman J, Najib J, Staels B: Activation of peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem*; **273**: 25573-25580 (1998)
 14. Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, Remaley AT, Neve B, Torra IP, Teissier E, Minnich A, Jaye M, Duverger N, Brewer B, Fruchart JC, Clavey V, Staels B: PPAR- α and PPAR- γ activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of ABCA1 pathway. *Nat Med*; **7**: 53-58 (2000)
 15. Collins T: Endothelial nuclear factor-kappa B and the initiation of the atherosclerotic lesion. *Lab Invest*; **68**: 499-508 (1993)
 16. Davies PF: Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev*; **75**: 519-560 (1995)
 17. Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H, Auwerx J: The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem*; **272**: 18779-18789 (1997)
 18. Forman BM, Chen J, Evans RM: Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci USA*; **94**: 4312-4317 (1997)
 19. Fruebis J, Silvestre M, Shelton D, Napoli C, Palinski W: Inhibition of VCAM-1 expression in the arterial wall is shared by structurally different antioxidants that reduce early atherosclerosis in NZW rabbits. *J Lipid Res*; **40**: 1958-1966 (1999)
 20. Geng YJ, Henderson LE, Levesque EB, Muszynski M, Libby P: Fas is expressed in human atherosclerotic intima and promotes apoptosis of cytokine-primed human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; **17**: 2200-2208 (1997)

21. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ: Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*; **316**:1371-1375 (1987)
22. Goebler M, Gillitzer R, Kilian K, Utzel K, Bröcker EB, Rapp UR, Ludwig S: Multiple signalling pathways regulate NF- κ B-dependent transcription of the monocyte chemoattractant protein-1 gene in primary endothelial cells. *Blood*; **97**: 46-55 (2001)
23. Goetze S, Xi XP, Kawano H, Gotlibowski T, Fleck E, Hsueh WA, Law RE: PPAR γ -ligands inhibit migration mediated by multiple chemoattractants in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Pharmacol*; **33**: 798-806 (1999)
24. Goetze S, Xi XP, Kawano Y, Kawano H, Fleck E, Hsueh WA, Law RE: TNF- α -induced migration of vascular smooth muscle cells is MAPK dependent. *Hypertension*; **33**: 183-189 (1999)
25. Gosling J, Slaymaker S, Gu L, Tseng S, Zlot CH, Young SG, Rollins BJ, Charo IF: MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J Clin Invest*; **103**: 773-778 (1999)
26. Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ: Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell*; **2**: 275-281 (1998)
27. Haffner SM, Greenberg AS, Weston WM, 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)
28. Hattori Y, Hattori S, Kasai K: Troglitazone upregulates nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*; **33**: 943-948 (1999)
29. Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, Avila C, Kambham N, Bierhaus A, Nawroth P, Neurath MF, Slaterry T, Beach D, McClary J, Nagashima M, Morser 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)
30. Hori O, Brett J, Slaterry T, Cao R, Zhang J, Chen JX, Nagashima M, Lundh ER, Vijay S, Nitecki D, Morser J, Stern D, Schmidt AM: The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphotericin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of RAGE and amphotericin in the developing nervous system. *J Biol Chem*; **270**: 25752-25761 (1995)

31. Iiyama K, Hajra L, Iiyama M, Li H, DiChiara M, Medoff BD, Cybulsky MI: Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ Res*; **85**: 199-207 (1999)
32. Jiang C, Ting AT, Seed B: PPARgamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*; **391**: 82-86 (1998)
33. King H, Aubert RE, Herman WH: Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care*; **21**: 1414-1431 (1999)
34. 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 differentiation. *Cell*; **83**: 813-819 (1995)
35. Kliewer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, Devchand P, Wahli W, Willson TM, Lenhard JM, Lehmann JM: Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferators-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci USA*; **94**: 4318-4323 (1997)
36. Kurihara T, Warr G, Loy J, Bravo R: Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *J Exp Med*; **186**: 1757-1762 (1997)
37. 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)
38. Lee H, Shi W, Tontonoz P, Wang S, Subbanagounder G, Hedrick CC, Hama S, Borromeo C, Evans RM, Berliner JA, Nagy L: Role for peroxisome proliferator-activated receptor alpha in oxidized phospholipid-induced synthesis of monocyte chemotactic protein-1 and interleukin-8 by endothelial cells. *Circ Res* ; **87**: 516-521 (2000)
39. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison 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)
40. Li H, Cybulski MI, Gimbrone MA, Libby P: An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit endothelium. *Arterioscler Thromb*; **13**: 197-204 (1993)

41. 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)
42. Libby P: Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med*; **247**: 349-358 (2000)
43. Libby P: Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation*; **91**: 2844-2850 (1995)
44. Lu B, Rutledge BJ, Gu L, Fiorillo J, Lukacs NM, Kunkel SL, North R, Gerard C, Rollins BJ: Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte-chemoattractant protein 1-deficient mice. *J Exp Med*; **187**: 601-608 (1998)
45. Luster AD: Chemokines- chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med*; **338**: 436-445 (1998)
46. Marx N, Kehrle B, Kohlhammer K, Grüb M, Koenig W, Hombach V, Libby P, Plutzky J: PPAR activators as antiinflammatory mediators in human T-Lymphocytes. Implications for atherosclerosis and transplantation-associated arteriosclerosis. *Circ Res*; **90**: 703-710 (2001)
47. Marx N, Libby P, Plutzky J: Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their role in the vessel wall: possible mediators of cardiovascular risk? *J Cardiovasc Risk*; **8**: 203-210 (2001)
48. Marx N, Mach F, Sauty A, Sarafi M, Libby P, Plutzky J, Luster AD: PPAR γ activators inhibit Interferon gamma-induced expression of the T-cell-active CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC in human endothelial cells. *J Immunol*; **164**: 6503-6508 (2000)
49. Marx N, Mackman N, Schönbeck U, Yilmaz N, Hombach V, Libby P, Plutzky J: PPAR α activators inhibit Tissue factor expression and activity in monocytes. *Circulation*; **103**: 213-219 (2001)
50. 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)
51. Marx N, Sukhova G, Murphy C, Libby P, Plutzky J: PPAR α activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule 1 expression and migration in human vascular smooth muscle cells. *Circulation*; **99**: 3125-3131 (1999)
52. Marx N, Walcher D, Ivanova N, Rautzenberg K, Jung A, Friedl R, Hombach V, de Caterina R, Basta G, Wautier MP, Wautier JL: PPAR γ -activating thiazolidinediones

- reduce endothelial expression of receptors for advanced glycation endproducts (RAGEs). (Publikation in Vorbereitung)
53. Minamikawa J, Yamauchi M, Inoue D, Koshiyama H: Another potential use of troglitazone in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrin and Metabol*; **83**:1041 (1998)
 54. Moore KJ, Rosen ED, Fitzgerald MI, Randow F, Andersson LP, Altshuler D, Milstone DS, Mortensen RM, Spiegelman BM, Freeman MW: Role of PPAR- γ in macrophage differentiation and cholesterol uptake. *Nat Med*; **7**: 41-47 (2000)
 55. 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)
 56. O'Brien KD, Allen MD, McDonald TO, Chait A, Harlan JM, Fishbein D, McCarty J, Ferguson M, Hudkins K, Benjamin CD, Lobb R, Alpers CE: Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. Implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis. *J Clin Invest*; **92**: 945-951 (1993)
 57. Park L, Raman KG, Lee KJ, Lu Y, Ferran LJ Jr, 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)
 58. Pasceri V, Wu HD, Willerson JT, Yeh ET: Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators. *Circulation*; **101**: 235-238 (2000)
 59. Ping D, Boekhoudt G, Zhang F, Morris A, Philipson S, Warren ST, Boss JT: Sp1 binding is critical for promoter assembly and activation of the MCP-1 gene by tumor necrosis factor. *J Biol Chem*; **275**: 1708-1714 (2000)
 60. Pober JS, Cotran RC: cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev*; **70**: 427-451 (1990)
 61. Rand ML, Warren JS, Mansour MK; Newman W, Ringler DJ: Inhibition of T cell recruitment and cutaneous delayed-type hypersensitivity-induced inflammation with antibodies to monocyte-chemoattractant protein.1. *Am J Pathol*; **148**: 855-864 (1996)
 62. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK: The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*; **391**: 79-82 (1998)

63. Riede UN, Müntefering H, Drexler H, Ihling C, Schaefer HE: Kardiovaskuläres System. In: Riede UN, Schaefer HE Allgemeine und Spezielle Pathologie, 4. Auflage, Thieme Verlag, S. 435-523 (1995)
64. Ross R: Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med*; **340**:115-126 (1999)
65. Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG: Increased accumulation of the glycooxidation product N (epsilon)-(carboxymethyl) lysine in human tissues in diabetes and aging. *J Clin Invest*; **99**: 457-468 (1997)
66. Schmidt AM, Hasu Am, Popov D, Zhang JH, Chen J, Yan SD, Brett J, Cao R, Kuwabara K, Costache G, Smionescu N, Stern D: Receptor for advanced glycation end products (AGEs) has a central role in vessel wall interactions and gene activation in response to circulating AGE proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*; **91**: 8807-8811 (1994)
67. Schmidt AM, Hori O, Brett J, Yan SD, Wautier JL, Stern D: Cellular receptors for advanced glycation end products. Implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. *Arterioscler Thromb*; **14**: 1521-1528 (1994)
68. Schmidt AM, Stern D: Atherosclerosis and Diabetes: The RAGE Connection. *Curr Atheroscler Rep*; **2**: 430-436 (2000)
69. 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)
70. Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B, Auwerx J: PPAR alpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *Embo J*; **15**: 5336-5348 (1996)
71. Schoonjans K, Staels B, Auwerx J: Role of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J Lipid Res*; **37**: 907-925 (1996)
72. Schoonjans K, Staels B, Auwerx J: The peroxisome proliferators activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta*; **1302**: 93-109 (1996)
73. Shin WS, Szuba A, Rockson SG: The role of chemokines in human cardiovascular pathology: enhanced biological insights. *Atherosclerosis*; **160**: 91-102 (2002)

74. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin A: Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*; **44**: 129-146 (2001)
75. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC: Measurement of protein using bicinchonic acid. *Anal Biochem*; **150**: 76-85 (1985)
76. 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)
77. Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D: Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care*; **16**: 434-444 (1993)
78. Sukhova GK, Schonbeck U, Rabkin E, Schoen FJ, Poole AR, Billingham RC, Libby P: Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and-3 in vulnerable human atheromatous plaques. *Circulation*; **99**: 2503-2509 (1999)
79. Taguchi A, Blood DC, del Toro G, Canet A, Lee DC, Qu W, Tanji N, Lu Y, Lalla E, Fu C, Hofmann MA, Kislinger T, Ingram M, Lu A, Tanaka H, Hori O, Ogawa S, Stern DM, Schmidt AM: Blockade of RAGE- amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature*; **405**: 354-360 (2000)
80. Takeda K, Ichiki T, Tokunou T, Funakoshi Y, Iino N, Hirano K, Kanaide H, Takeshita A: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Activators downregulate Angiotensin II Type I Receptor in Vascular Smooth muscle cells. *Circulation*; **102**: 1834-1839 (2000)
81. Takeya M, Yoshimura T, Leonard EJ, Takahashi K: Detection of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerotic lesions by an anti-monocyte chemoattractant protein-1 monoclonal antibody. *Hum Pathol*; **24**: 534-539 (1993)
82. Tanaka N, Yonekura H, Yamagishi S, Fujimori H, Yamamoto Y, Yamamoto H: The receptor for advanced glycation end products is induced by the glycation products 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)
83. Thornalley PJ: Cell activation by glycated proteins. AGE receptors, receptor recognition factors and functional classification of AGEs. *Cell Mol Biol*; **44**: 1013-1023 (1998)

84. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM: Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a ligand-activated transcription factor. *Cell*; **79**: 1147-1156 (1994)
85. Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM: PPAR-gamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*; **93**: 241-252 (1998)
86. Ueda A, Okuda K, Ohno S, Shirai A, Igarashi T, Matsunaga K, Fukushima J, Kawamoto S, Ishigatsubo Y, Okubo T: NF- κ B and Sp1 regulate transcription of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene. *J Immunol*; **153**: 2052-2063 (1994)
87. Xin X, Yang S, Kowalski J, Gerritsen ME: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands are potent inhibitors of angiogenesis in vitro and in vivo. *J Biol Chem*; **274**: 9116-9121 (1999)
88. Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A, Slattery T, Zhao L, Nagashima M, Morser J, Migheli A, Nawroth P, Stern D, Schmidt AM: RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature*; **382**: 685-691 (1996)
89. Yan SD, Yan SF, Chen X, Fu J, Chen M, Kuppusamy P, Smith MA, Perry G, Godman GC, Nawroth P, Zweier JL, Stern D: Non-enzymatically glycosylated tau in Alzheimer's disease induces neuronal oxidant stress resulting in cytokine gene expression and release of amyloid beta-peptide. *Nat Med*; **1**: 693-699 (1995)
90. Yan SD, Zhu H, Zhu A, Golabek A, Du H, Roher A, Yu J, Soto C, Schmidt AM, Stern D, Kindy M: Receptor-dependent cell stress and amyloid accumulation in systemic amyloidoses. *Nat Med*; **6**: 643-651 (2000)

12 DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater und Betreuer PD Dr. Nikolaus Marx für die Bereitstellung des Themas, die Übernahme der Doktorvaterschaft und die konstante, hervorragende Betreuung des Projekts danken. Er hat damit und auch im klinischen Bereich meine Ausbildung entscheidend gefördert. Die Zusammenarbeit mit ihm war stets überaus angenehm. Weiterhin danke ich ihm für die kritische Durchsicht des Manuskripts, wodurch diese Arbeit erfolgreich abgeschlossen werden konnte.

Prof. Dr. Hombach möchte ich für die Bereitstellung des Labors und der technischen Geräte danken, ohne die die Entstehung dieser Arbeit nie möglich gewesen wäre.

Auch den Mitarbeitern und Doktoranden im Labor, Miriam Grüb, Helga Bach und Renate Durst gilt mein großer Dank für die Einarbeitung, großzügige Unterstützung, beständige Anleitung, Tipps, Kniffe und aufmunternde Worte bei der praktischen Arbeit.

Das Arbeiten in diesem netten Team war immer sehr angenehm und hat mir jeden Tag aufs Neue viel Spass gemacht.

Weiterhin gilt mein Dank dem Graduiertenkolleg Ulm für die wissenschaftliche Weiterbildung und finanzielle Förderung mit einem Doktorandenstipendium.

Und nicht zuletzt sei auch ganz besonders meinen Eltern und allen Menschen gedankt, die mich auf meinem Berufs- und Lebensweg begleitet und unterstützt haben.

13 LEBENSLAUF

Persönliche Daten:

Name: Jung
 Vorname: Annelie Susanne
 Geburtsdatum/-ort: 09.09.1977, Pforzheim
 Familienstand: ledig

Schulbildung:

09/1984-07/1988 Arlinger-Grundschule in Pforzheim
 10/1988-06/1997 Reuchlingymnasium in Pforzheim
 1997 Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung:

10/1997 Universität Ulm: Studiengang Medizin
 09/1999 Ärztliche Vorprüfung
 08/2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung,
 04/2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung,
 seit 06/2001 Promotion bei PD. Dr. N. Marx, Abteilung für
 Innere Medizin II (Kardiologie), Universität Ulm
 Thema: Peroxisome Proliferator Activated Receptor
 γ -aktivierende Glitazone vermindern die Ansprech-
 barkeit humaner Endothelzellen auf proinflam-
 matorische Advanced Glycation Endproducts –
 Effekte

Praktisches Jahr

04/2003-06/2003 Innere Medizin: Universitätsklinikum Ulm
 06/2003-08/2003 Innere Medizin: Frere Hospital, East London,
 Südafrika
 08/2003-12/2003 Chirurgie: Kantonsspital Luzern, Schweiz
 seit 12/2003 Augenheilkunde: Universitätsklinikum Ulm