

Universität Ulm

Abteilung für Innere Medizin II – Kardiologie

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Vinzenz Hombach

**Peroxisome proliferator-activated  
receptors (PPARs) und die  
Lymphozytenmigration**

**Dissertation**

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

Von

**Katharina Andrea Heß**

Berlin-Wilmersdorf

2004

Amtierender Dekan: Prof. Dr. med. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Marx

2. Berichterstatter: PD Dr. v. Tirpiz

Tag der Promotion: 29.06.06

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	2
<b>I. Einleitung</b> .....	4
1. Atherogenese .....	4
2. T-Lymphozyten .....	7
3. Migration .....	8
4. PPAR Aktivatoren .....	10
5. Fragestellung .....	13
<b>II. Material und Methodik</b> .....	14
1. Material .....	14
1.1 Substanzen und Lösungen .....	14
1.2 Geräte und Kits .....	16
2. Methodik .....	17
2.1 Isolation CD4-positiver Lymphozyten .....	17
2.2 Migration CD4-positiver Zellen .....	22
2.3 Zellvitalität .....	24
2.4 Statistik .....	25
<b>III. Ergebnis</b> .....	26
1. Effekt der PPAR alpha Aktivatoren .....	26
2. Effekt der PPAR gamma Aktivatoren .....	27
3. Effekt der PPAR alpha und gamma Aktivatoren auf die Vitalität .....	32
<b>IV. Diskussion</b> .....	33
1. PPAR alpha .....	33
2. PPAR gamma .....	35
3. PPAR-Effekt in T-Zellen .....	38
4. PPAR-Effekt auf die Atherogenese .....	39
<b>V. Zusammenfassung</b> .....	41
<b>VI. Literaturverzeichnis</b> .....	43

## Abkürzungsverzeichnis

µg	Mykrogramm
µL	Mykroliter
µmol	Mykromol
BRL	Rosiglitazon
BSA	Bovines Serum Albumin
B-Zellen	B-Lymphozyten
C	Zystein
CC	β Chemokin
CD	Cluster of differentiation
Co	Kontrolle
CRP	C-reaktives Protein
CXC	α Chemokin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GW-1929	[(N-12-Benoylphenyl)-L-tyrosine PPAR <sub>γ</sub> Agonist]
ICAM	intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
IL	Interleukin
L	Liter
LDL	Low density lipoproteins
MACS	Magnetic cell sorting
M-CSF	Macrophage colony stimulating factor
MHC	Major Histocompatibility Complex
Min	Minute
Mio	Millionen
MIP	Makrophage-inflamatory protein

ml	Milliliter
MMP	Matrix Metalloproteinase
n	Anzahl
ng	Nanogramm
NK	Natürliche Killer Zellen
p	Signifikanzniveau
PBS	Phosphate buffered saline
Pio	Pioglitazon
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
R	Rezeptor
RANTES	Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
RPM	Rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SDF-1 $\alpha$	Stromal cell-Derived Factor 1 Alpha
SEM	Mean $\pm$ standard error of the mean
SMC	Smooth muscle cell
TCR	T cell receptor
TH1-Zellen	T-Helfer-1-Zellen
TNF	Tumor necrosis factor
T-Zellen	CD4-positive Lymphozyten
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VSMC	Vascular smooth muscle cell
WY-14643	4-Chloro-6-(2,3-xylidino)-2-pyrimidinylthio acetic acid
X	Aminosäure

## **I. Einleitung**

### **1. Atherogenese**

Die Atherosklerose – mit ihren Folgen koronarer Herzkrankheit, Myokardinfarkt und zerebralem Insult – ist heute in den meisten westlichen Industrieländern die häufigste Todesursache im Erwachsenenalter (Hach-Wunderle 2001).

Unter Arteriosklerose versteht man eine weit verbreitete Systemerkrankung, die degenerativ und chronisch fortschreitet und zu produktiven Veränderungen der Gefäßwand führt. Diese Veränderungen betreffen vor allem die mesenchymalen Zellen der Intima und der inneren Schichten der Media der Arterienwand (Hoffman-La Roche AG 1998). Die arterio-sklerotischen Läsionen finden sich vor allem in großen und mittleren elastischen sowie muskulären Arterien (Ross 1999).

Die Atherogenese, die Entstehung der Atherosklerose, ist ein komplexer und zum Teil bis heute nicht vollständig geklärter Prozess. Zu den Risikofaktoren zählen nicht beeinflussbare und beeinflussbare Dinge. Als nicht beeinflussbares Risiko gelten das Alter, das männliche Geschlecht und das genetische Erbgut. Beeinflussbar sind durch einen Wandel im Lebensstil oder durch eine entsprechende Medikation Hyperlipoproteinämie, Diabetes mellitus, Hypertension, Rauchen, Übergewicht und zu wenig körperliche Betätigung (Libby, in: Braunwald 2001).

Arbeiten der letzten Jahre sehen die Atherogenese als einen inflammatorischen Prozess in der Gefäßwand, der über Jahre und Jahrzehnte abläuft. Dabei werden inflammatorische Zellen wie Monozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten (T-Zellen) sowie inflammatorische Mediatoren wie Zytokine, Wachstumsfaktoren und Chemokine involviert (Libby et al. 1999; Libby et al. 2002; Ross 1999).

Beobachtungen an Mensch und Tier legen nahe, dass die ersten Schritte in der Arteriosklerose durch eine endotheliale Dysfunktion gekennzeichnet sind. Die Folge ist eine erhöhte Endothelpermeabilität und Insudation von Lipoproteinen und anderen Plasmakomponenten wie C-reaktives Protein (CRP) in die Gefäßwand (Napoli et al. 1997). Gleichzeitig kommt es zur Aktivierung des Endothels mit nachfolgender Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche, wie vascular cell adhesion molecule (VCAM) 1 und intercellular adhesion molecule (ICAM) 1, beide Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie, und P-selectin, aus der Familie der Leukozyten Rezeptoren. In der Folge kommt es zu einer festen Anheftung von Leukozyten an das Endothel. Einmal angeheftet, penetrieren einige der Lymphozyten, vor allem Monozyten und T-Zellen, in die Gefäßwand (Cybulsky et al. 1991; Li et al. 1993; Nelken et al. 1991; Wang et al. 1991).

Die in die Arterienwand gewanderten Makrophagen nehmen Lipide über rezeptorgesteuerte Endozytose auf und wandeln sich in Schaumzellen um (Libby, in: Braunwald 2001). Die so genannten Scavenger-Rezeptoren erlauben es ihnen auch modifizierte Lipoproteine aufzunehmen (Libby et al. 2002). Diese lipidbeladenen Makrophagen charakterisieren das frühe Stadium der Arteriosklerose, der Fatty-Streak Läsion. Zusätzlich sezernieren die Makrophagen Wachstumsfaktoren und

Zytokine. Einer dieser Faktoren, der macrophage colony stimulating factor (M-CSF) ist an der bereits erwähnten Umwandlung von Monozyten in Schaumzellen beteiligt (Ross 1999). Die in die Gefäßwand eingewanderten T-Lymphozyten, vor allem CD4-positiven Zellen, differenzieren sich zu so genannten T-Helfer-1 (TH1-) Zellen und setzen ebenfalls proinflammatorische Zytokine wie Interferon-gamma ( $IFN\gamma$ ), Tumor necrosis factor alpha ( $TNF\alpha$ ) und Interleukin-2 (IL-2) frei. (Hannsson et al. 1988; Stemme et al. 1995; Stemme et al. 1994). Die von Monozyten/Makrophagen und T-Lymphozyten freigesetzten Zytokine führen wiederum, im Sinne eines Circulus vitiosus, zu einer erneuten Aktivierung der Gefäßwandzellen und Leukozytenrekrutierung (Raines et al. 1993).

Zur fortgeschrittenen Läsion kommt es im weiteren Verlauf durch Apoptose und Zelltod sowie durch proteolytische Aktivität und weitere Lipid-akkumulation. Es entsteht die arteriosklerotische Plaque mit einem nekrotischen Lipidkern (Ross 1999). Dieser Kern besteht aus Lipiden, Leukozyten und zugrunde gegangenen Zellen. Er wird von einer fibrösen Kappe aus Gefäßmuskelzellen und extrazellulärer Matrix geschützt. Durch eine Ausdünnung der fibrösen Kappe, unter dem Einfluss proinflammatorischer Mediatoren wie  $IFN\gamma$  oder durch von Makrophagen sezernierten matrixdegradierenden Enzymen, geht die stabile Plaque in eine instabile Form über (Amento et al. 1991; Libby et al. 1996). In der Folge kann es unter dem Einfluss von Scherkräften zur Ruptur der instabilen Plaque und konsekutiv zur Ausbildung okkludierender oder nicht-okkludierender Thromben an der rupturierten Plaque kommen. Das klinische Korrelat solcher Plaquerupturen stellt das akute Koronarsyndrom mit instabiler Angina pectoris oder akutem Myokardinfarkt dar (Libby, Circulation 2001).



## **2. T-Lymphozyten**

Thymusabhängige Lymphozyten werden kurz auch T-Zellen genannt. 70 bis 80% der mononukleären Zellen im Blut sind T-Lymphozyten. Gebildet und geprägt im Thymus, halten sich später die reifen T-Zellen nur zu circa 2% im peripheren Blut auf. Der überwiegende Teil der T-Zellen findet sich im Ductus thoracicus, in den Lymphknoten und der Milz. Sie sind die primären Effektorzellen der zellulär vermittelten Immunabwehr. Man unterscheidet strukturell mehrere Subpopulationen, die durch die Oberflächenantigene Cluster of differentiation (CD)4 und CD8 gekennzeichnet sind. Zwei Drittel der Zellen sind CD4-positiv, etwa ein Drittel CD8-positiv. Nur 5% der Zellen exprimieren keines der beiden Oberflächenantigene, sie werden „Null-Zellen“ genannt. CD4-positive Helfer-Zellen sind vor allem regulatorisch wirkende Zellen. Sie steuern die T- und B-Zell-Funktion sowie die der Monozyten durch die Produktion von Zytokinen und direkten Zellkontakt. CD8-positive Zellen, auch als zytotoxische Zellen bezeichnet, sind in der Lage, viral infizierte körpereigene Zellen oder dem Körper fremde Zellen zu lysieren (Eppinger 2001).

T-Lymphozyten können nicht direkt auf fremde Antigene reagieren. Vielmehr müssen die Antigene von Antigen präsentierenden Zellen aufgenommen, in kleine Peptid-Fragmente zerteilt und in Zusammenhang mit Major Histocompatibility Complex (MHC) II Molekülen auf der Oberfläche präsentiert werden. Endogene Antigene wie zum Beispiel Peptide einer virusbefallenen Zelle werden im Zusammenhang mit MHC I präsentiert. Erst auf diese Weise wird ein Erkennen durch den T-Zell Rezeptor möglich (Haynes et al. 2001). CD4-positive T-Lymphozyten interagieren nur mit Klasse-II-MHC-Molekülen, während CD8-positive T-

Lymphozyten mit Klasse-I-MHC-Molekülen interagieren und so an fast alle kernhaltigen Zellen binden können (Eppinger 2001). Nach Bindung der Lymphozyten an die MHC-Moleküle erfolgt eine intrazelluläre Signaltransduktion, die letztendlich zu einer Expression von Zytokinen führt (Haynes et al. 2001). Darunter fallen auch proinflammatorische Mediatoren wie  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$  und IL-2, die zu einer Aktivierung anderer Gefäßwandzellen führen und auf diese Weise das Fortschreiten der Plaqueentwicklung fördern. Zusätzlich kommt es unter dem Einfluss von  $\text{IFN}\gamma$  zu einer verminderten Synthese der Matrixbestandteile Kollagen und Elastin und somit während der fortgeschritteneren Stadien der Arteriosklerose zu einer Schwächung der fibrösen Kappe der arteriosklerotischen Plaque. Zusätzlich werden mit Hilfe der Zytokine Makrophagen aktiviert, die ihrerseits eine proinflammatorische Wirkung in der Gefäßwand besitzen (Amento et al. 1991; Binder et al. 2002). Die Migration der T-Lymphozyten in die arteriosklerotische Läsion stellt auf Grund dieser Modulationsmöglichkeiten einen wichtigen Schritt in der Atherogenese dar (Ross 1999).

### **3. Migration**

CD4-positive Lymphozyten brauchen, um agieren zu können, den direkten Kontakt mit dem Antigen. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, zu ihren Zielzellen in das Gewebe migrieren zu können. Postkapilläre Venulen kontrollieren diese Wanderung vom Blut in die Peripherie. Aus Motilitätsstudien über CD4-positive Zellen weiß man, dass diese eine polarisierte Struktur besitzen. Der führende Pol weist Chemokinrezeptoren auf, es folgen der Zellkörper mit dem Kern und eine Endstruktur, die unter anderem Adhäsionsstrukturen beherbergt. Während des Kontaktes mit dem Antigen findet ein Strukturwandel statt (Serrador et al. 1999). Um den Blutstrom zu verlassen, bedarf es

mehrerer Schritte. Zuerst müssen sich die CD4-positiven Lymphozyten mit Hilfe von ihren Adhäsionsrezeptoren wie L-Selektin, P- und E-Selektin an das Endothel anheften. Diese Bindungen sind jedoch nicht stabil genug, um die Zellen zu halten. Durch den Blutstrom getrieben, rollen die Zellen über die Gefäßwand. Um diese Bewegung zu stoppen, brauchen die Lymphozyten einen zweiten Rezeptor aus der Familie der Integrine, erst dann heften sie sich fest an. Es folgt die Diapedese in das Gewebe.

Die Integrine, derer es zum festen Anhaften bedarf, müssen im Gegensatz zu den Selektinen erst aktiviert werden, indem sie Signale von Chemokinen von der Gefäßwand erhalten. Die Chemokine werden nach der Position ihrer Cysteingruppen in vier Untergruppen unterteilt. CXC ( $\alpha$  Chemokin; C: Zystein, X: Aminosäure), die zwei Cysteinsäuren werden von einer anderen Aminosäure separiert, die Rezeptoren heißen CXCRs (C: Zystein, X: Aminosäure, R: Rezeptor); CC ( $\beta$  Chemokin) besteht aus zwei Cysteinsäuren und die entsprechenden Rezeptoren werden CCRs genannt. Die beiden anderen Gruppen heißen CX<sub>3</sub>C und XC. Sie haben jeweils nur einen Rezeptor (Andrian et al. 2000).

Es sind eine Reihe von Chemokinen bekannt, die - an die jeweiligen Rezeptoren gebunden - zur Migration der CD4-positiven Zelle führen können. In der vorliegenden Arbeit liegt der Schwerpunkt auf den Chemokinen RANTES (Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) und SDF-1 $\alpha$  (Stromal cell-Derived Factor 1 Alpha).

RANTES ist ein Chemokin, das in entzündlichen Läsionen exprimiert wird und dessen Produktion von durch IFN $\gamma$  stimulierten Endothelzellen hochreguliert wird. Es bindet ebenso wie Macrophage-inflammatory protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) und MIP-1 $\beta$  an den Rezeptor CCR5 (Kawai et al.

1999; Kuroiwa et al. 2000; Taguchi et al. 1998). RANTES scheint während der Migration nicht die Adhäsion der Zellen zu beeinflussen, sondern für Diapedese verantwortlich zu sein (Kawai et al. 1999).

SDF-1 ist im Körper in zwei Varianten vorhanden. SDF-1 $\alpha$  und SDF-1 $\beta$ . Es wird durch eine Reihe von Zellen und Geweben produziert und findet sich ebenfalls in entzündlichem Gewebe. Als Chemokin dient es vor allem Monozyten, B-Vorläuferzellen und T-Zellen (Blades et al. 2002; Nanki et al. 2000). Es bindet an den CXCR4 Rezeptor, der auf Endothelzellen und T-Lymphozyten exprimiert wird. Es hat sich gezeigt, dass SDF-1 $\alpha$  speziell an Fibronektin bindet und auf diese Weise präsentiert konzentrationsabhängig Einfluss auf die Migration nimmt. Wobei sich feststellen lässt, dass auch SDF-1 $\alpha$  scheinbar keinen Einfluss auf die Adhäsion der CD4-positiven Zellen besitzt. Vielmehr hat sich in Experimenten herausgestellt, dass sich die Zellen bei Stimulation mit SDF-1 $\alpha$  polarisieren und orientieren sowie im weiteren Verlauf eine der Migration entsprechende Morphologie annehmen (Pelletier et al. 2000).

#### **4. PPAR Aktivatoren**

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) gehören zur Gruppe der nukleären Hormonrezeptoren. Nach der Aktivierung durch spezifische Liganden bilden sie einen heterodimeren Komplex mit einem anderen nukleären Rezeptor, dem Retinoid-X-Rezeptor. Sie binden an definierte PPAR-response-elements in der Promotorregion spezieller Zielgene, deren Expression sie regulieren. Derzeit werden drei PPAR-Subtypen unterschieden: alpha ( $\alpha$ ), gamma ( $\gamma$ ) und delta ( $\delta$ ), wobei über PPAR $\delta$  wenig bekannt ist (Plutzky 2003). Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Subtypen  $\alpha$  und  $\gamma$ . Das Vorkommen der Rezeptoren verteilt sich unterschiedlich auf die Gewebe. PPAR $\alpha$  wird

vorwiegend von Zellen mit einem hohen Umsatz von Fettsäuren exprimiert, wie zum Beispiel in Leber, Muskel, im Herzen und in der Haut. PPAR $\gamma$  findet sich vor allem im Fettgewebe, im Darm und in der Gefäßwand. Beiden Subtypen ist gemeinsam, dass sie von Zellen des Immunsystems exprimiert werden, es handelt sich um Monozyten/Makrophagen, B- und T-Lymphozyten (Angeli 2003). Aktiviert werden PPARs durch natürliche und synthetische Liganden. PPAR $\alpha$  als Regulator vieler metabolischer Stoffwechselwege, der vor allem zentrale Prozesse im Lipidstoffwechsel steuert, kann durch lipidsenkende Fibrate oder mehrfach ungesättigte Fettsäuren aktiviert werden. PPAR $\gamma$  ist ein Schlüsselregulator in der Lipogenese, greift in den Glucosestoffwechsel ein und vermindert so die periphere Insulinresistenz (Plutzky 2003). Er wird durch Prostaglandinderivate, oxidierte Linolensäuren sowie eine neue Gruppe Antidiabetika, Thiazolidinedione wie Troglitazon, Rosiglitazon oder Pioglitazon aktiviert (Delerive et al. 2001). Den Fibraten und den Thiazolidinedionen ist gemeinsam, dass sie sich bereits in klinischer Anwendung befinden.

Zusätzlich zu den bereits genannten Funktionen der PPARs konnten in den letzten Jahren durch zahlreiche Studien immer mehr Erkenntnisse dazu gewonnen werden. So scheinen die PPARs die Arteriogenese modulieren zu können. Durch eine reduzierte VCAM-1 Expression und ein herunterreguliertes intracellular adhesions molecule-1 nehmen sie beispielsweise Einfluss auf die Zellrekrutierung und -aktivierung. Sie inhibieren die Expression inflammatorischer Gene für Zytokine, Metalloproteasen und akute Phase Proteine und besitzen auf diese Art möglicherweise eine antiinflammatorische Aktivität in Monozyten/Makrophagen, Endothelzellen, smooth muscle cells (SMCs), Dendritischen Zellen und T-Zellen (Marx et al. 2004). Hinzu kommt, dass sie die Akkumulation der Lipide in den Plaque durch einen gesteigerten Cholesterolefflux und verringerte Schaumzell-Formierung positiv

beeinflussen. Sie stabilisieren die Plaque durch verringerte Aktivität der Metalloproteasen und modulieren die Plättchenaggregation (Barbier et al. 2002). Weiterhin konnte bereits gezeigt werden, dass PPAR $\gamma$  Liganden die Migration von Monozyten (Colins et al. 2001) und vascular smooth muscle cells (VSMCs) (Hsueh et al. 2001; Marx 2002) inhibieren. In Tiermodellen mit Mäusen und Ratten zeigte sich, dass sich die Größe arteriosklerotischer Läsionen verkleinerte und eine Restenose nach Therapie mit PPAR $\gamma$  Liganden seltener wurde (Marx 2002).

Bisher liegen keine Daten über die Wirkung von PPAR-Aktivatoren auf das Migrationsverhalten von T-Lymphozyten vor. Vor dem Hintergrund einer Beteiligung der T-Lymphozyten in der frühen Phase der Atherogenese untersucht die vorliegende Studie die Wirkungen von PPAR $\alpha$ - und - $\gamma$ -Aktivatoren auf die Migration CD4-positiver T-Lymphozyten. In Anbetracht der Tatsache, dass sich PPAR-Aktivatoren bereits in klinischer Anwendung befinden, könnte eine Hemmung der T-Zellmigration einen neuen klinisch anwendbaren Mechanismus darstellen, die Atherogenese zu modulieren.

## **5. Fragestellung**

In der vorliegenden Studie wird die Bedeutung von PPAR $\alpha$ - und PPAR $\gamma$ -Aktivatoren auf das Migrationsverhalten CD4-positiver Lymphozyten untersucht.

Im Einzelnen ergeben sich daraus folgende Fragestellungen:

1. Welchen Effekt haben PPAR $\alpha$ -Aktivatoren auf das Migrationsverhalten CD4-positiver Lymphozyten?
2. Welchen Effekt haben PPAR $\gamma$ -Aktivatoren auf das Migrationsverhalten CD4-positiver Lymphozyten?
3. Haben PPAR $\alpha$ - und PPAR $\gamma$ -Aktivatoren einen Einfluss auf die Vitalität der CD4-positiven Zellen?

## II. Material und Methodik

### 1. Material

#### 1.1 Substanzen und Lösungen

Aqua bidest	Delta-Pharma, Germany
Bovines Serum Albumin	PAA Laboratories GmbH, Austria
Collagen I	0,03 mg/ml Collagen I in PBS Sigma Diagnostics, USA
DMSO	Sigma Diagnostics, USA
EDTA	Sigma Diagnostics, USA
Eosin	Dade Behring, Germany
Ethanol	Riedel-de Haen, Germany
GW-1929	Alexis, USA
Humanes Serum	PAA Laboratories GmbH, Austria
Lymphozyten-Separationsmedium	PAA Laboratories GmbH, Austria
MACS-Puffer	PBS mit 2mM EDTA 10% humanes Serum 0,5% BSA
Medium Lymphozyten	RPMI 1640 0,5% humanes Serum 1% Penicillin/Streptomycin
Methanol	Merck, Germany
PBS	PAA Laboratories GmbH, Austria
PBS + EDTA	500ml PBS 2ml 0,5M EDTA
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Germany
Pioglitazon	Tadeda Chemical Industries, USA
RANTES	PeptoTechInc, USA



Rosiglitazon	Glaxo Smith Kline, USA, BRL 49653-C
RPMI 1640	PAA Laboratories GmbH, Austria
SDF-1 $\alpha$	Upstate, USA
Thiazin	Dade Behring, Germany
Trypanblau	Serva, Germany
Vitro-Clud (Eukitt)	Langenbrinck, Germany
WY-14643	Biomol, USA

## 1.2 Geräte und Kits

Boyden Chamber	Receptor Technologies Ltd., England
Brutschrank	Heraeus, Germany
Deckplättchen	Marienfeld, Germany
Filter	Nucleopore Track-Etch Mambrane
Kimwipes Lite	Kimberly-Clark, USA
Laminar Air Flow Bench	Heraeus, Germany
Leukosep-Isolationsröhrchen	Greiner bio-one, Germany
MACS CD4+ T cell Isolation Kit II	Miltenyi Biotech, USA
MACS Separation Columns, 25LS Columns	Miltenyi Biotech, USA
MACS Multi Stand	Miltenyi Biotech, USA
Mikroskop	Zeiss, Germany
Neubauer-Zählkammer	Brand, Germany
Nucleopore Track-Etch Mambrane	Whatman, England
Objektträger	Glasbläserei Ulm, Germany
Pipetten	Gilson, France
Pre-Separation Filters	Miltenyi Biotech, USA
Reagenzgläser	Greiner, Germany
Reaktionsgefäße 1,5ml	Safe Lock, Eppendorf, Germany
Reaktionsgefäße 15ml/50ml	FALCON, Becton Dickinson, USA
Trennsäule	MACS Separation Columns, 25LS Columns
Zellkulturschalen 100mm	FALCON, Becton Dickinson, USA
Zentrifuge	Varifuge 3.0, Heraeus, Germany

## 2. Methodik

### 2.1 Isolation CD4-positiver Lymphozyten

#### 2.1.1 Herkunft des Blutes

Das für die Isolation der CD4-positiven Lymphozyten notwendige Blut wurde bestellt und am Tag der Isolation in Form von buffy coats aus der Blutspendezentrale Ulm abgeholt. Die buffy coats enthalten die für eine Transfusion nicht geeigneten Leukozyten und Thrombozyten zwischen Plasma und sedimentierten Erythrozyten.

#### 2.1.2 Isolation mononukleärer Zellen aus dem Blut

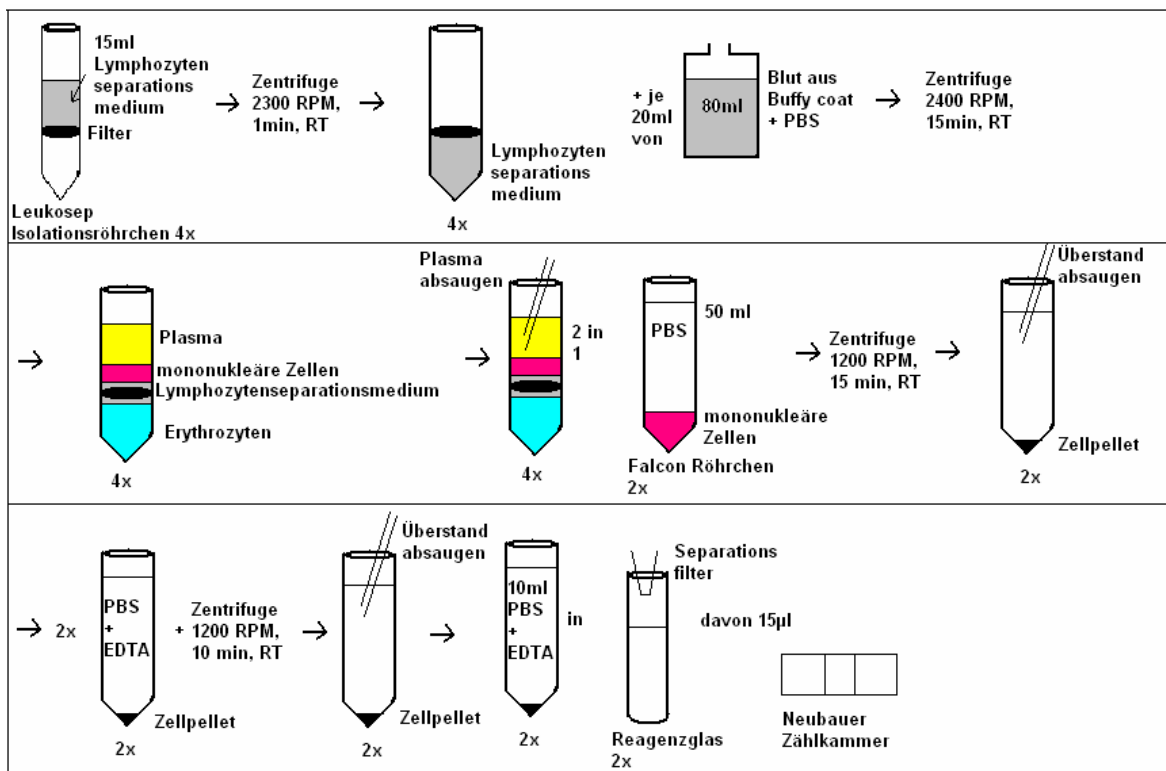


Abbildung 1: Die mononukleären Zellen werden mit Hilfe von einer Ficoll-Gradientenzentrifugation von den Erythrozyten getrennt. Es folgen Waschschritte mit PBS und PBS+ EDTA. Der Separationsfilter trennt aneinander haftende Zellen voneinander. 15µL der Zellsuspension werden in die Neubauer Zählkammer gegeben

und unter dem Mikroskop (nicht abgebildet) die Zellzahl bestimmt. RPM = Rounds per minute; min = Minute; RT = Raumtemperatur; 2 in 1 = der Inhalt zweier Röhrrchen wird in eines gegeben; EDTA = Ethylendiamintetraacetat; PBS = Phosphate buffered saline.

Vor Beginn der Isolation wurden Lymphozyten-Seperationsmedium und Phosphate buffered saline (PBS) für circa 10 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Für einen buffy coat wurden vier Leukosep-Isolationsröhrrchen benötigt. In jedes wurde nach Inkubation des Mediums 15ml Lymphozytenseperationsmedium gegeben. Die Leukosep-Röhrrchen haben in ihrer Mitte eine Filterscheibe. Anschließend wurde zentrifugiert (2300 Rounds per minute [RPM], 1 Minute [min], Raumtemperatur [RT]). Durch die Zentrifugation gelangte das Lymphozyten-Seperationsmedium unter die Filterscheibe. Dies war die Ausgangssituation, um später Lymphozyten von Erythrozyten und Granylozyten zu trennen.

Im nächsten Schritt wurde das Blut aus dem buffy coat mit PBS auf ein Volumen von 80ml verdünnt und jeweils 20ml in ein Leukosepröhrrchen gegeben. In den Röhrrchen befand sich nun unter dem Filter das Lymphozytenseperationsmedium und über dem Filter das mit PBS verdünnte Blut. Es wurde zentrifugiert (2400 RPM, 15 min, RT). Nach der Zentrifugation fanden sich von unten nach oben folgende Schichten: die Erythrozyten, das Lymphozytenseperationsmedium, die Filterscheibe, Lymphozytenseperationsmedium, die mononuklearen Zellen als gewünschte Fraktion, das Plasma als oberste Schicht. Das Plasma wurde vorsichtig abgesaugt, die Zellschicht zweier Leukosepröhrrchen wurde in jeweils ein 50ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde mit PBS auf 50ml aufgefüllt und zentrifugiert (1200 RPM, 10 min, RT). Nach der Zentrifugation fanden sich die Zellen als Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes, darüber das PBS mit Resten des Plasmas. Der

Überstand wurde abgesaugt, das Pellet mit 1ml PBS + Ethylendiamintetraacetat (EDTA) resuspendiert. Es wurde mit PBS + EDTA auf je 50ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert (1200 RPM, 10 min, RT). Dieser Waschschrift wurde noch einmal genau so wiederholt. Der Überstand wurde wieder abgesaugt, das Pellet jeweils in 1ml PBS + EDTA resuspendiert und auf 10ml aufgefüllt. Danach wurden die Lösungen je durch einen Pre-Separations Filter mit einer Porengröße von 30µm gegeben. Der Filter sollte aneinander klebende Zellen separieren, um so die Zellen optimal für die magnetische Zellseparation mit Magnetic cell sorting (MACS) vorzubereiten. Nach diesem Schritt wurden 15µL aus der gut gemischten Zellsuspension entnommen und die Zellen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt. Währenddessen wurden die restliche Suspension zentrifugiert (1200 RPM, 6 min, 8°C).

### 2.1.3 Magnetische Zellseparation der CD4-positiven Zellen

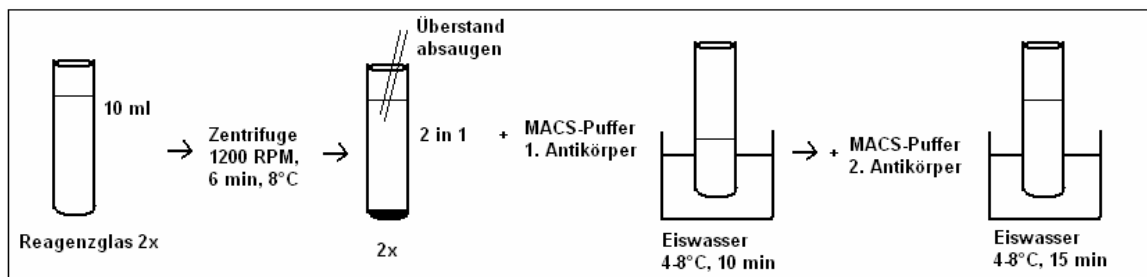


Abbildung 2: Die 10ml Zellsuspension, die im Schritt zuvor durch den Separationsfilter gegeben worden ist, wird herunterzentrifugiert und der Überstand verworfen. Es werden 40µL kalter MACS-Puffer pro  $10^7$  Gesamtzellen hinzugegeben und entsprechend 10µL des Biotin Antikörper Cocktails pro  $10^7$  Gesamtzellen zugefügt. Es wird für 10 Minuten im 4-8°C kaltem Eiswasser inkubiert. Anschließend wird 30µL des MACS-Puffers und 20µL Anti-Biotin Micro Beads pro  $10^7$  Gesamtzellen hinzugegeben und für 15 Minuten im Eiswasser bei 4-8°C inkubiert. RPM = Rounds per minute; min = Minute; 2 in 1 = der Inhalt zweier Reagenzgläser wird in eines überführt; 1. Antikörper = Biotin Antikörper Cocktail; 2. Antikörper = Anti-Biotin Micro Beads.

In den sich anschließenden Schritten wurde die Suspension in ein Eis-Wasserbad gestellt. Nach der Zentrifugation wurde wiederum der Überstand abgesaugt und das Pellet in 40µL kaltem MACS-Puffer pro  $10^7$  Gesamtzellen resuspendiert. Die aufgeteilten Suspensionen wurden in ein Reagenzglas überführt. Es wurden 10µL des Biotin Antikörper Cocktails, aus dem MACS CD4+ T cell Isolation Kit II pro  $10^7$  Gesamtzellen hinzugefügt. Die Suspension wurde gut gemischt und für 10 Minuten bei 4-8°C im Eis-Wasserbad inkubiert. Nach dieser Phase wurden 30µL des MACS-Puffers und 20µL Anti-Biotin Micro Beads pro  $10^7$  Gesamtzellen hinzugegeben, ebenfalls MACS CD4+ T cell Isolation Kit II. Es wurde gut gemischt und für 15 Minuten bei 4-8°C inkubiert.

Zur Erklärung sei folgendes hinzugefügt: Die biotinylierten Antikörper sind gegen die nicht-CD4-positiven Zellen gerichtet, z.B. CD8 positive Zellen,  $\gamma/\delta$  T Zellen, B Zellen, Natürliche Killer (NK) Zellen, Dentritische Zellen, Monozyten, Granulozyten und Erythrozyten, indem er an CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, T cell receptor (TCR)  $\gamma/\delta$  und Glycophorin A bindet. Der zweite Antikörper ist gegen Biotin gerichtet und an eisenträgende Micro Beads gekoppelt. Auf diese Weise werden die nicht-CD4-positiven Zellen magnetisch markiert, während die CD4-positiven Zellen unmarkiert bleiben.

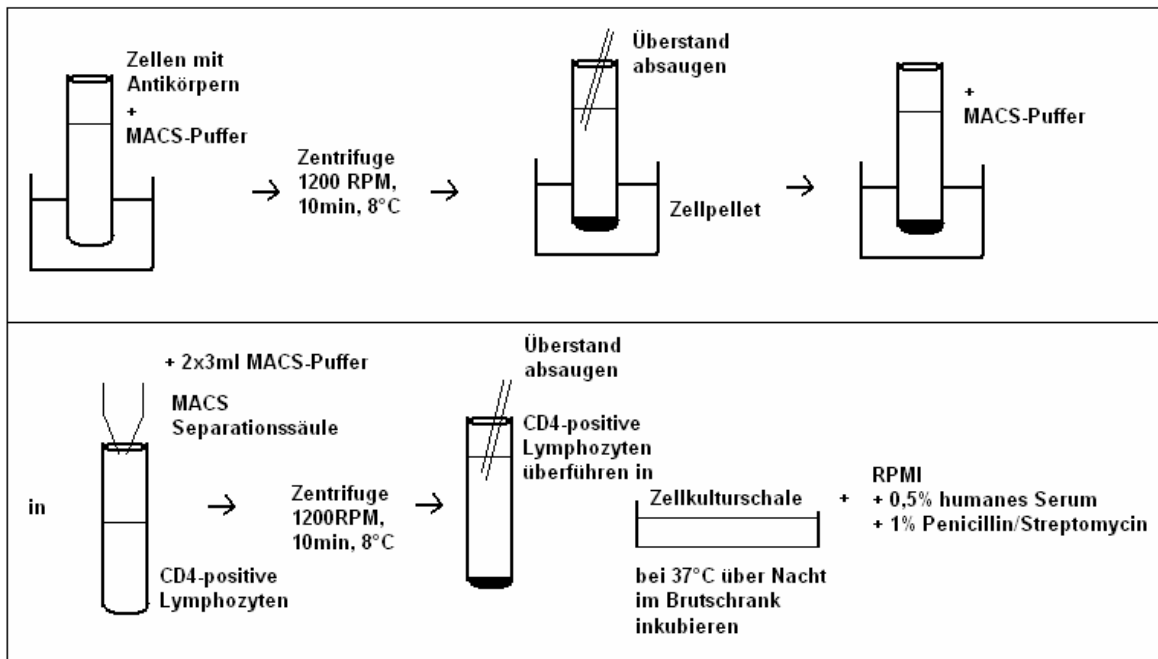


Abbildung 3: Der mit den Antikörpern inkubierten Zellsuspension wird das 10-20fache Volumen MACS-Puffer hinzu gegeben und zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen bis zu  $10^8$  in  $500\mu\text{L}$  MACS-Puffer resuspendiert. Diese Suspension wird durch die Separationssäule gegeben, die am magnetischen MACS-Multistand (nicht abgebildet) befestigt ist. Anschließend werden  $2 \times 3\text{ml}$  MACS-Puffer in die Säule gegeben. Man erhält die CD4-positiven Lymphozyten im MACS-Puffer gelöst. Es wird zentrifugiert, der Überstand verworfen und die CD4-positiven Lymphozyten in eine Zellkulturschale mit Nährmedium (RPMI + 0,5% humanes Serum + 1% Penicillin/Streptomycin) gegeben und über Nacht im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. RPM = Rounds per minute; min = Minute; MACS = Magnetic cell sorting.

Nach 15 minütiger Inkubationszeit wurde der Zellsuspension das 10-20fache Volumen MACS-Puffer hinzugegeben und zentrifugiert (1200 RPM, 10 min,  $8^\circ\text{C}$ ). Bereits jetzt wurde parallel das Nährmedium, Roswell Park Memorial Institute (RPMI) mit 0,5% humanem Serum und 1% Penicillin/Streptomycin, im Wasserbad auf  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Der MACS Multi Stand wurde mit zwei MACS Separations Säulen ohne Stempel aufgebaut, je ein Reagenzglas kam unter die Säulen. Es wurde mit je 3ml MACS-Puffer vorgespült, die Reagenzgläser mit dem vorgespülten MACS-Puffer wurden verworfen und durch zwei frische ersetzt. Nach der

Zentrifugation wurden die Zellen bis zu  $10^8$  in 500 $\mu$ L MACS-Puffer resuspendiert. Lag die Zellzahl höher, musste das Puffervolumen entsprechend angepasst werden. Die Zellsuspension wurde je zur Hälfte in die Säulen gegeben. War die Suspension mit den markierten, nicht-CD4-positiven Zellen in die Säulen gelaufen, wurde zweimal mit je 3ml MACS-Puffer nachgespült. Es handelt sich bei der magnetischen Zellseparation um eine negative Selektion. Die durch die Antikörper magnetisch markierten nicht-CD4-positiven Zellen bleiben in der Säule, die CD4-positiven Zellen werden wieder ausgewaschen. Die so erhaltene Suspension mit CD4-positiven Zellen wurde noch einmal zentrifugiert (1200 RPM, 10min, RT). Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 1ml des vorgewärmten Nährmediums gelöst und in eine Zellkulturschale mit 20ml Nährmedium überführt. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

## **2.2 Migration CD4-positiver Zellen**

Die verwendete Migrationskammer war eine 48 well boyden chamber. Sie bestand aus einem unteren Teil mit 48 in Dreierreihen nebeneinander angeordneten „wells“, einer Gummidichtung und einer Deckplatte, in denen beiden die wells identisch zur Grundplatte waren. Der Filter kam zwischen Grundplatte und Gummidichtung mit seiner angerauhten Seite nach unten. Die Kammer wurde mit 6 Schrauben verschlossen.

Die Migration wurde am Vortag vorbereitet. Die Migrationskammer wurde über Nacht im Brutschrank bei 37°C vorgewärmt. Der Filter wurde ebenfalls über Nacht bei Raumtemperatur mit Collagen I beschichtet, indem er in eine mit Collagen I gefüllte Schale mit seiner rauhen Seite nach oben gelegt wurde. Am Migrationstag wurde als erstes der Filter aus dem Collagen I genommen und an der Luft für circa eine halbe bis zu



einer Stunde zum Trocknen aufgehängt. RPMI wurde im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Anschließend wurden die Zellen, die über Nacht im Brutschrank im Nährmedium befanden, herunterzentrifugiert (1200 RPM, 10 min, RT). Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 1ml RPMI resuspendiert. Die Zellen wurden in 10ml RPMI gelöst und gut gemischt. Es wurden 15µL entnommen, in die Neubauer-Zählkammer gegeben und unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Zellen wurden mit RPMI auf 5 Mio/ml eingestellt. Jeweils 0,5ml der Zellsuspension wurde in ein 1,5ml Reaktionsgefäß pipettiert. In Negativ- und Positivkontrolle wurden keine weiteren Zusätze gegeben. Zu den restlichen 0,5ml Zellsuspensionen wurden jeweils 0,5µL des jeweils gewünschten Inhibitors zugegeben und gut vermischt. Diese Zellsuspensionen kamen für 30 Minuten in den Brutschrank. Währenddessen war der Filter getrocknet und wurde mit der rauhen Seite nach oben in RPMI gelegt und in den Brutschrank gestellt, ebenfalls für 15 bis 30 min. Als nächstes wurden die Vertiefungen der Grundplatte gefüllt, 28,5µL pro Loch. Bei der Kontrolle handelte es sich ausschließlich um RPMI. Die chemotaktischen Substanzen, RANTES und SDF-1 $\alpha$ , wurden mit RPMI gemischt (1ml RPMI und 1µL RANTES; 1ml RPMI und 2µL SDF-1 $\alpha$ ). Nach Auflegen des Filters mit seiner rauhen Seite nach unten wurden die Gummidichtung und die Deckplatte aufgelegt und mit den Schrauben festgezogen. In die oberen Vertiefungen wurden je 45,5µL der präinkubierten Zellsuspensionen pipettiert. Es war darauf zu achten, dass keine Luftblasen entstanden, da sonst keine Migration hätte stattfinden können. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 3 Stunden bei 37°C im Brutschrank. In dieser Zeit wanderten die Zellen entlang des chemotaktischen Gradienten nach unten und durch die Filterporen hindurch auf dessen rauhe Seite. Diese rauhe Seite sollte den Zellen das Anheften an den Filter erleichtern. Nach der dreistündigen Inkubationsphase wurde die Kammer aufgeschraubt, der Filter

entnommen und für 10 Minuten in Methanol mit seiner rauhen Seite nach oben fixiert. Danach wurde der fixierte Filter für 1,5 Minuten in Eosin und anschließend für 3,5 Minuten in Thiazin inkubiert. Anschließend wurde er in Aqua destillata gewaschen und mit seiner rauhen Seite nach unten auf einen vorher mit 70% Ethanol gereinigten Objektträger gelegt. Die jetzt nach oben zeigende glatte Seite wurde vorsichtig mit fusselfreiem Papier (Kimwipes lite) abgewischt. Dadurch wurden die Zellen entfernt, die zwar auf dem Filter saßen, aber nicht durch ihn hindurch gewandert waren. Das Aufkleben des Deckglases erfolgte mit Hilfe von Eukitt. Es wurde über Nacht bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Am nächsten Tag wurde aus den drei identischen Experimenten eines ausgewertet. Das entsprechende Experiment wurde nach der Verteilung der Zellen auf dem Filter ausgewählt. Dafür wurden 5 zufällige Gesichtsfelder mit einer 40fachen Vergrößerung betrachtet.

### **2.3 Zellvitalität**

Um zu überprüfen, ob der bei der Migration gesehene Effekt der Inhibitoren nicht auf eine erhöhte Zelltodrate zurückzuführen war, wurde die Zellvitalität mit Trypanblau nachgewiesen. Dafür wurden die Reaktionsansätze in den 1,5ml Reaktionsgefäßen belassen und während der Inkubationszeit gemeinsam mit der Migrationskammer in den Brutschrank gestellt. Nach Beendigung der Migration wurden 15 $\mu$ L Zellsuspension entnommen und mit 15 $\mu$ L Trypanblau gut gemischt. Nach 30 Sekunden wurden die Zellen in der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop betrachtet. Vitale Zellen schafften es in dieser Zeit, den blauen Farbstoff aus ihrem Cytoplasma herauszutransportieren; sie erschienen hell. Da tote Zellen keinen Stoffwechsel mehr haben, sammelte sich in ihnen der Farbstoff, sie waren blau. Es wurden alle Zellen inklusive den toten gezählt und im zweiten Schritt nur die toten, so dass ein prozentuales Verhältnis gebildet werden konnte.

## **2.4 Statistik**

Die Ergebnisse dieser experimentellen Studie wurden als  $\text{mean} \pm \text{standard error of the mean (SEM)}$  dargestellt. Die Unterschiede wurden mittels ONE-WAY ANOVA und nachfolgendem Duncan's post-hoc-test untersucht. Ein  $p\text{-Wert} < 0,05$  wurde als signifikant betrachtet.

### III. Ergebnis

#### 1. Effekt der PPAR-alpha-Aktivatoren

Es wurde die Wirkung des PPAR $\alpha$ -Aktivators Wy-14643 (4-Chloro-6-(2,3-xylylidino)-2-pyrimidinylthio acetic acid) auf die Migration CD4-positiver Lymphozyten untersucht. Gleichzeitig wurden die Zellen mit den Zytokinen Rantes und SF-1 $\alpha$  stimuliert, wobei die CD4-positiven Zellen 30 Minuten mit Wy-14643 vorbehandelt wurden. Nach einer dreistündigen Inkubationszeit in der modifizierten Boyden-Kammer zeigte Rantes (100ng/ml) eine Induktion von  $3,0 \pm 1,0$  im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Wy-14643 führte in derselben Zeit in einer Konzentration von  $50 \mu\text{mol/l}$  ( $p < 0,05$ ) zur maximalen Inhibition.

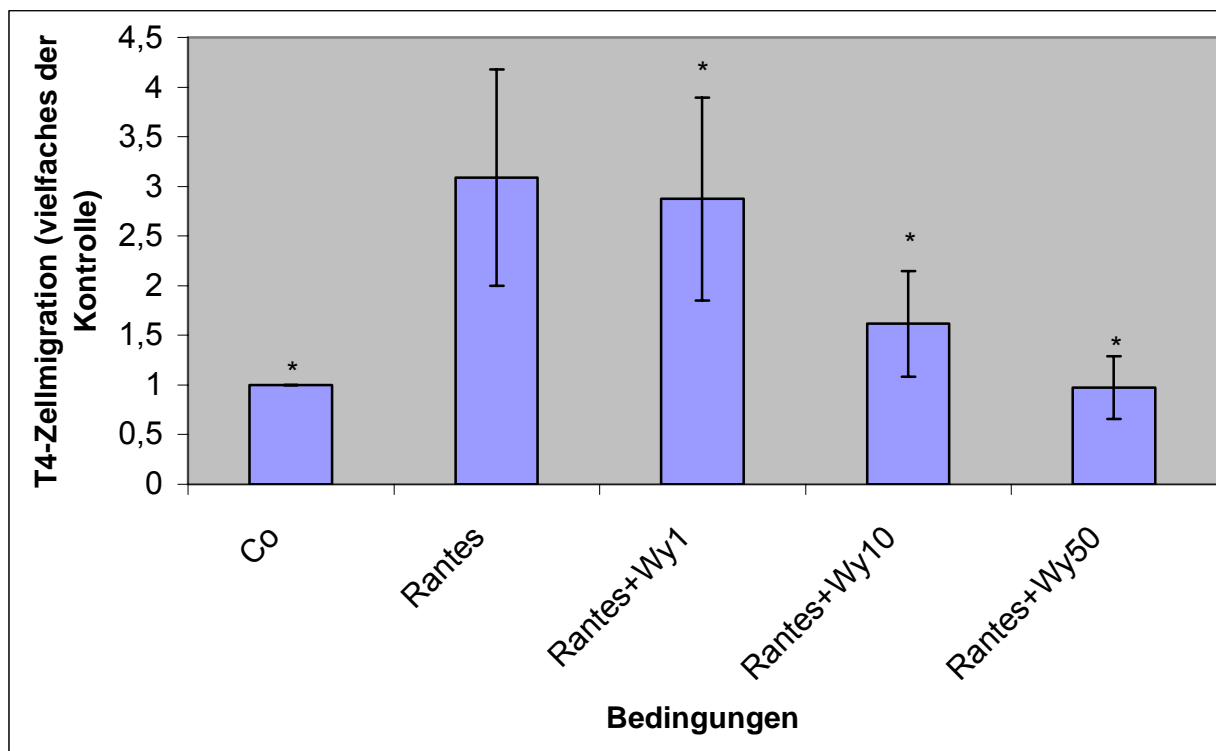


Abbildung 4: Wy-14643 (1 oder 10 oder 50  $\mu\text{mol/l}$ ; Wy1, Wy10, Wy50) inhibiert konzentrationsabhängig die CD4-positive Zellmigration. Die CD4-positiven Zellen wurden 30 Minuten mit Wy-14643 vorbehandelt und dann mit Rantes (100ng/l) für die Zeit der Migration (3h) stimuliert. Die Säulen zeigen Mittelwert $\pm$ Standardfehler; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zu unstimulierten Zellen;  $n=5$ .

Ebenfalls drei Stunden inkubiert, hemmte Wy-14643 konzentrationsabhängig die SDF-1 $\alpha$  induzierte Migration mit einer maximalen Inhibition bei 50 $\mu$ mol/l.

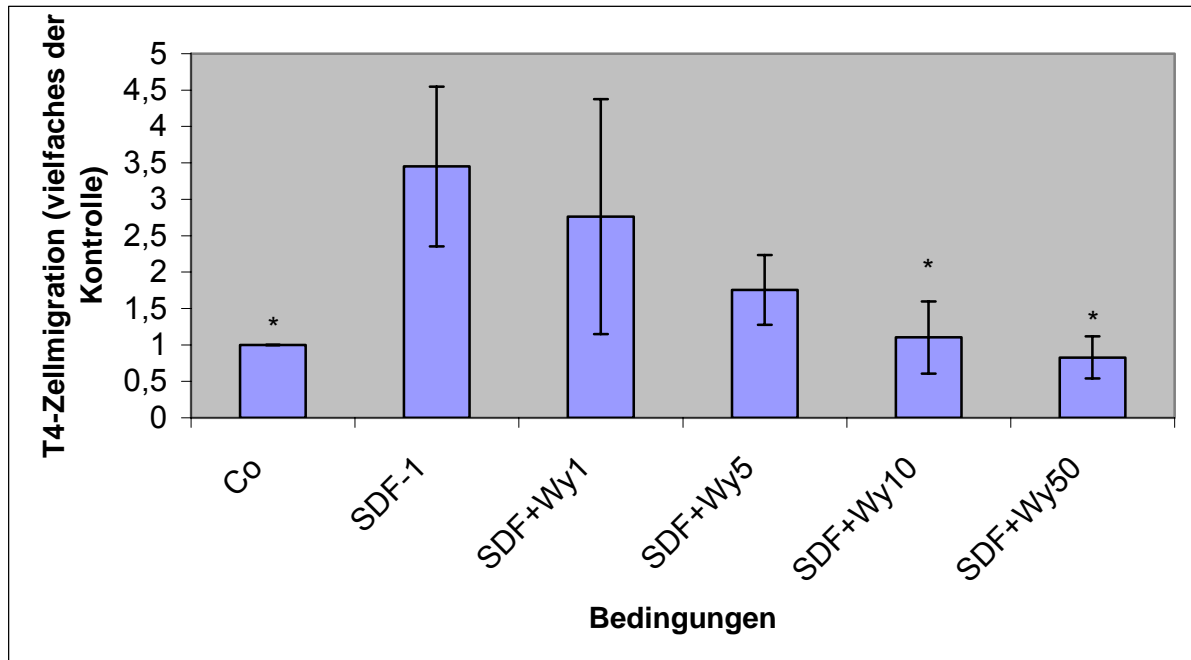


Abbildung 5: Wy-14643 (1 oder 5 oder 10 oder 50  $\mu$ mol/l; Wy1, Wy5, Wy10, Wy50) inhibiert konzentrationsabhängig die Migration. Die CD4-positiven Lymphozyten wurden 30 Minuten mit Wy-14643 vorinkubiert und während der dreistündigen Migration mit SDF-1 $\alpha$  (200 $\mu$ g/l) stimuliert. Mittelwert $\pm$ Standardfehler; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zu unstimulierten Zellen;  $n=4$ .

## 2. Effekt der PPAR-gamma-Aktivatoren

Um die Effekte der PPAR $\gamma$ -Aktivatoren zu testen, wurden die CD4-positiven Zellen ebenfalls mit den Zytokinen Rantes und SDF-1 $\alpha$  sowie mit den Inhibitoren Rosiglitazon (BRL) und Pioglitazon (Pio) für drei Stunden inkubiert, die Zellen wurden 30 Minuten mit den Inhibitoren vorbehandelt. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe zeigt sich für Rantes (100ng/l) eine Induktion von  $3,0 \pm 1,0$ . Rosiglitazon zeigt in

einer Konzentration von 5µmol/l die stärkste Inhibition ( $p<0,05$ ). Pioglitazon wirkte am effektivsten mit einer Konzentration von 1µmol/l.

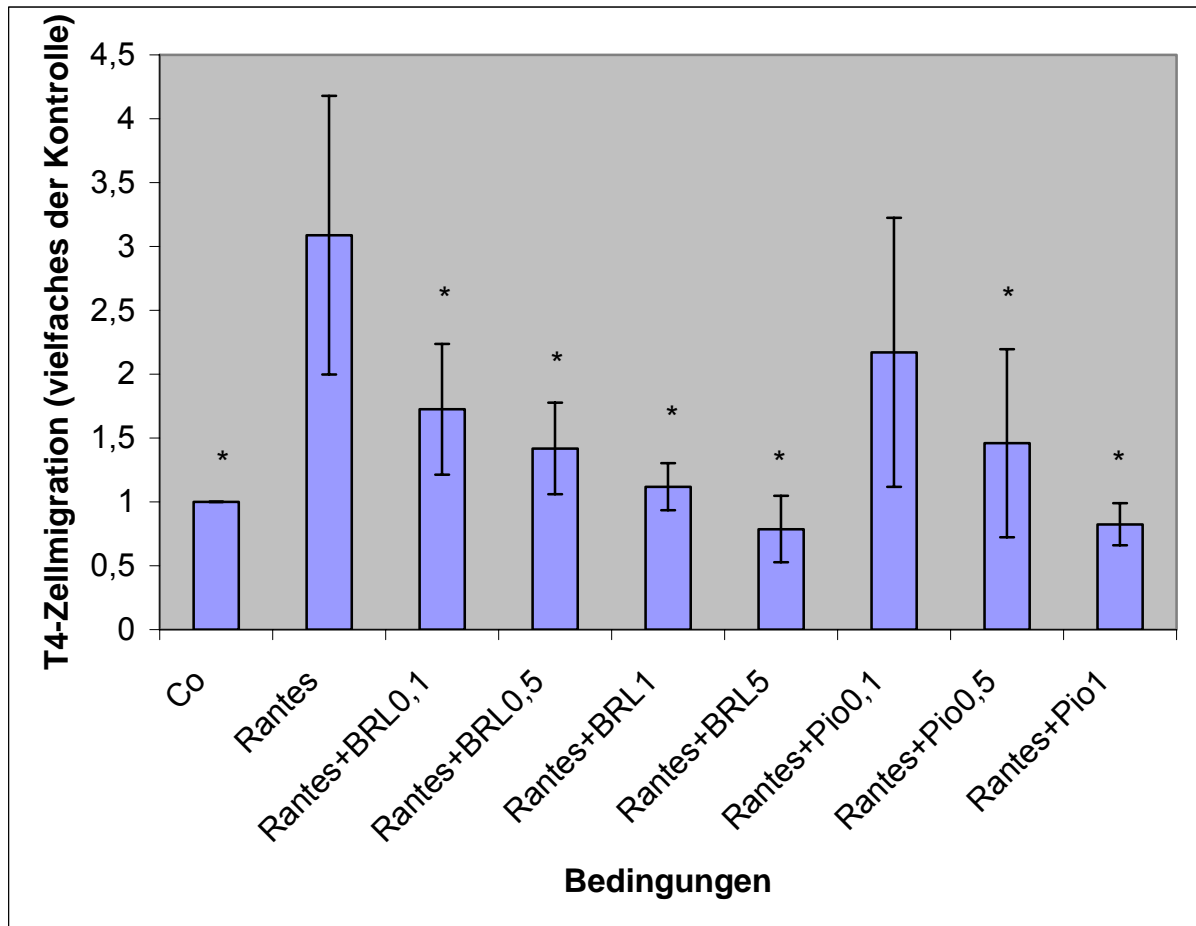


Abbildung 6: Sowohl Rosiglitazon (BRL) (0,1 oder 0,5 oder 1 oder 5 µmol/l; BRL01, BRL0,5, BRL1, BRL5) als auch Pioglitazon (Pio) (0,1 oder 0,5 oder 1 µmol/l; Pio0,1, Pio0,5, Pio1), beide antidiabetisch wirksame Glitazone, hemmen konzentrationsabhängig die Migration humaner CD4-positiver Lymphozyten. Die Zellen wurden 30 Minuten mit den Inhibitoren vorinkubiert und wurden für 3h mit Rantes (100ng/l) während der Untersuchung stimuliert. Mittelwert±Standardfehler; \*  $p<0,05$  im Vergleich zu unstimulierten Zellen; n=5.

Rantes durch SDF-1 $\alpha$  ausgetauscht führte zu einer Induktion von  $3,4 \pm 1,2$  im Vergleich mit den nichtstimulierten Zellen in der Kontrolle. Hier zeigten die PPAR $\gamma$ -Aktivatoren Rosiglitazon und Pioglitazon jeweils mit einer Konzentration von 5  $\mu\text{mol/l}$  ihre stärkste Inhibition.

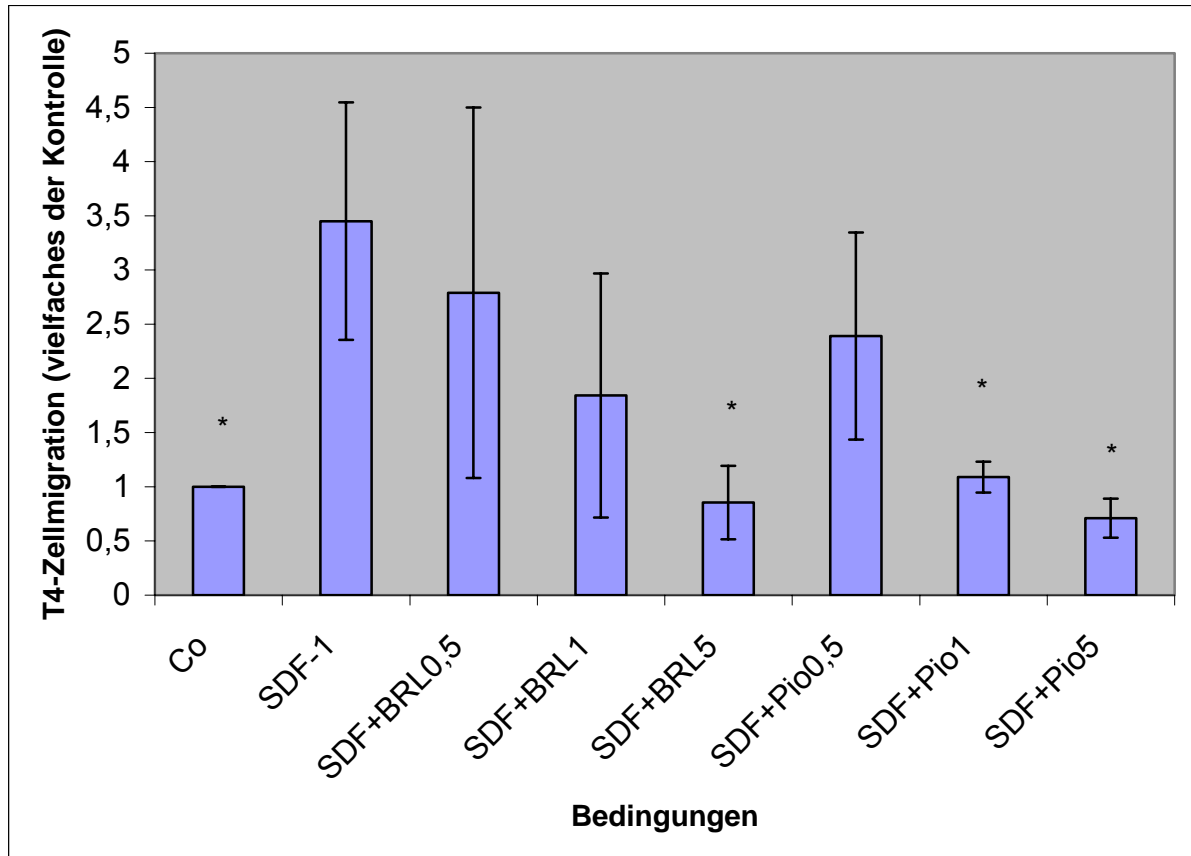


Abbildung 7: Die antidiabetischen Glitazone Rosiglitazon (BRL) (0,5 oder 1 oder 5  $\mu\text{mol/l}$ ; BRL0,5, BRL1, BRL5) und Pioglitazon (Pio) (0,5 oder 1 oder 5  $\mu\text{mol/l}$ ; Pio0,5, Pio1, Pio5) hemmen beide konzentrationsabhängig die Migration der humanen CD4-positiven Zellen. Die Lymphozyten wurden vorher 30 Minuten mit den Inhibitoren inkubiert und während der Migration (3h) mit SDF-1 $\alpha$  (200  $\mu\text{g/l}$ ) stimuliert. Mittelwert $\pm$ Standardfehler; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zu unstimulierten Zellen;  $n=4$ .

Zusätzlich wurde untersucht, welche Effekte GW-1929 ([N-12-Benoylphenyl)-L-tyrosine PPAR $\gamma$  Agonist]), ein Nicht-Thiazolidinedion PPAR $\gamma$ -Aktivator, auf die T4-Zellmigration hat. Auch hier wurden die Zellen vorher 30 Minuten mit GW-1929 in vier verschiedenen Konzentrationen vorstimuliert. Nach der dreistündigen Inkubation zeigte sich, dass unter Verwendung von Rantes (100ng/l) als Stimulus ( $3,0 \pm 1,0$  Induktion) GW-1929 die stärkste Inhibition in einer Konzentration von  $1 \mu\text{mol/l}$  zeigte.

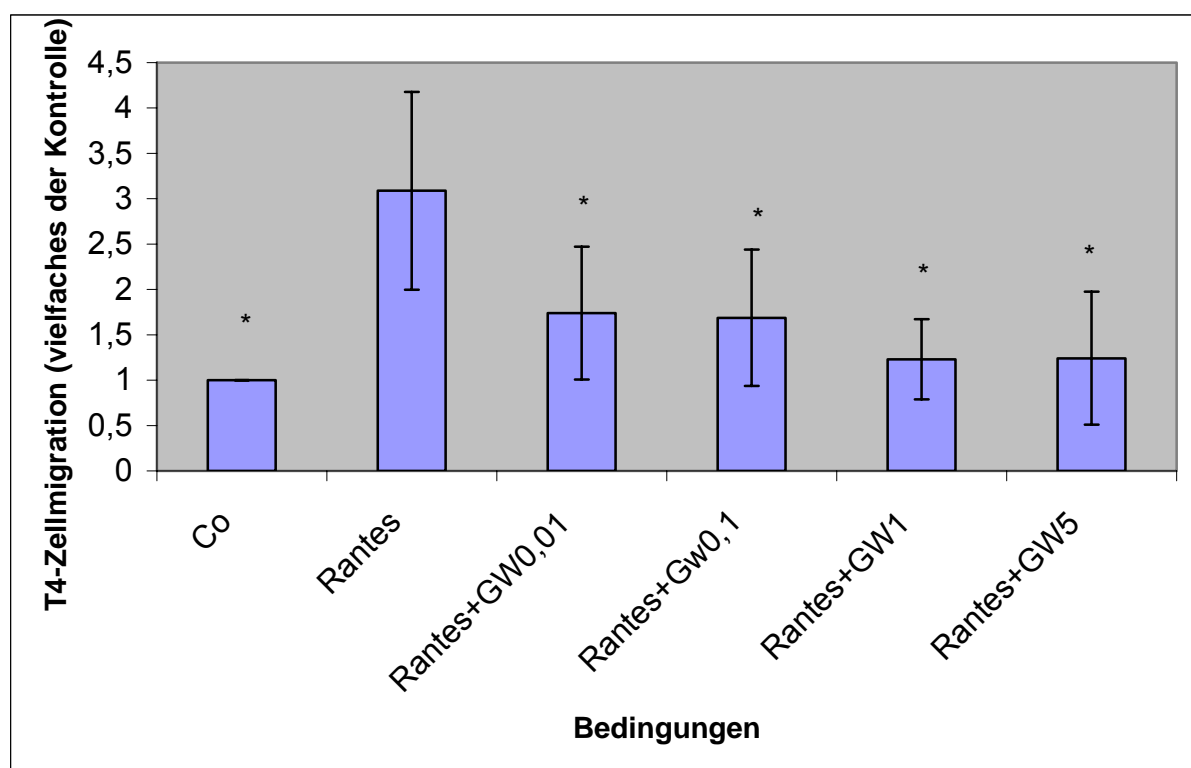


Abbildung 8: GW-1929 (0,01 oder 0,1 oder 1 oder 5  $\mu\text{mol/l}$ ; GW0,01, GW0,1, GW1, GW5) inhibiert die Migration der CD4-positiven Zellen. Die Zellen wurden 30 Minuten lang mit GW-1929 inkubiert, bevor sie während der Migration mit Rantes (100ng/l) stimuliert wurden. Mittelwert $\pm$ Standardfehler; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zu unstimulierten Zellen;  $n=7$ .



Wenn statt Rantes der Stimulus SDF-1 $\alpha$  ( $3,4\pm 1,2$  Induktion) verwendet wurde, inhibierte GW-1929 die T4-Zellmigration in einer Konzentration von  $5\mu\text{mol/l}$  am effektivsten.

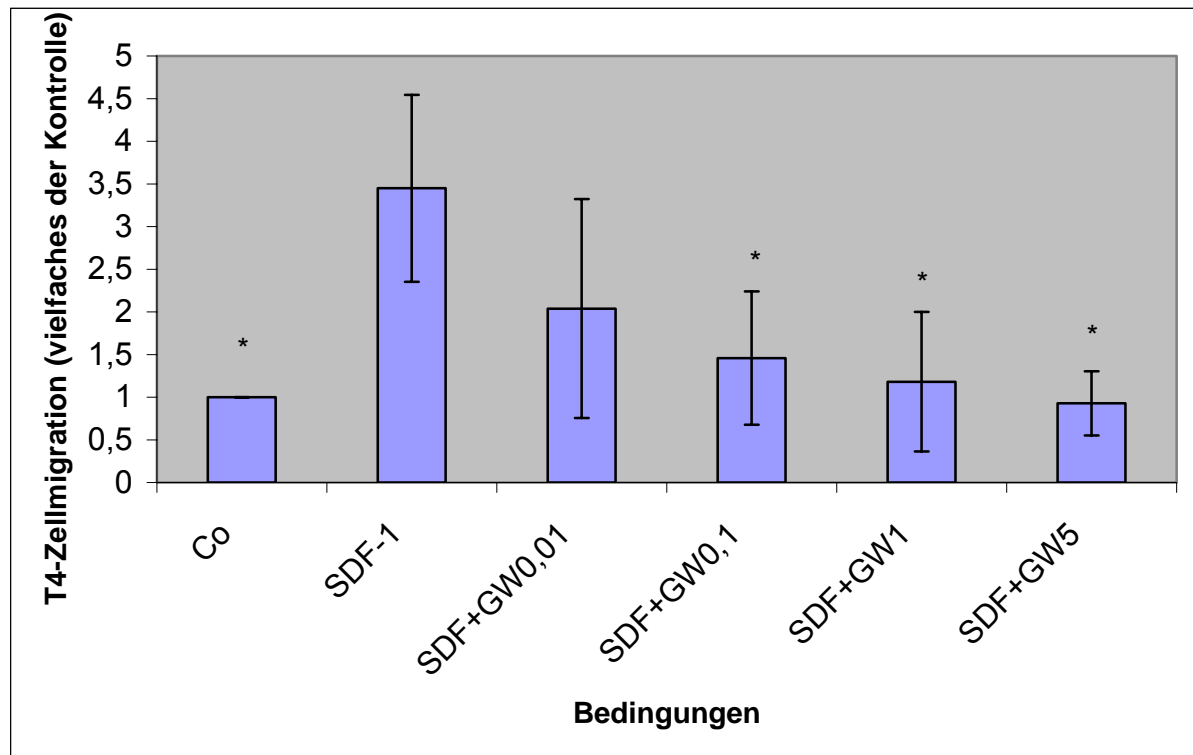


Abbildung 9: GW-1929 ( $0,01$  oder  $0,1$  oder  $1$  oder  $5\mu\text{mol/l}$ ; GW0,01, GW0,1, GW1, GW5) inhibiert konzentrationsabhängig die Migration der CD4-positiven Zellen. Die Lymphozyten wurden vorher für 30 Minuten mit GW-1929 vorinkubiert und anschließend während der Migrationsuntersuchung mit SDF-1 $\alpha$  ( $200\mu\text{g/l}$ ) stimuliert. Mittelwert $\pm$ Standardfehler; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zu unstimulierten Zellen;  $n=6$ .

Um eine Inhibition der T4-Zellmigration durch das Lösungsmittel der Inhibitoren auszuschließen, wurden die CD4-positiven Zellen ebenfalls 30 Minuten lang nur mit Dimethylsulfoxid (DMSO) vorbehandelt und nach einer dreistündigen Inkubationszeit mit Rantes ( $100\text{ng/l}$ ) beziehungsweise SDF1 $\alpha$  ( $200\mu\text{g/l}$ ) betrachtet. Es zeigte sich keine Inhibition der T-Zellmigration (nicht abgebildet).

### 3. Effekt der PPAR-alpha- und -gamma-Aktivatoren auf die Vitalität

Um nachzuweisen, dass die gesehenen Effekte nicht alleine auf einem Absterben der Zellen während der Migration zurückzuführen sind, wurde die Vitalität der Zellen mit Trypanblau nachgewiesen. Die Zellen wurden unmittelbar nach der dreistündigen T4-Zellmigration untersucht. Es zeigt sich, dass die Mehrzahl der Zellen bei Migrationsende am Leben ist.

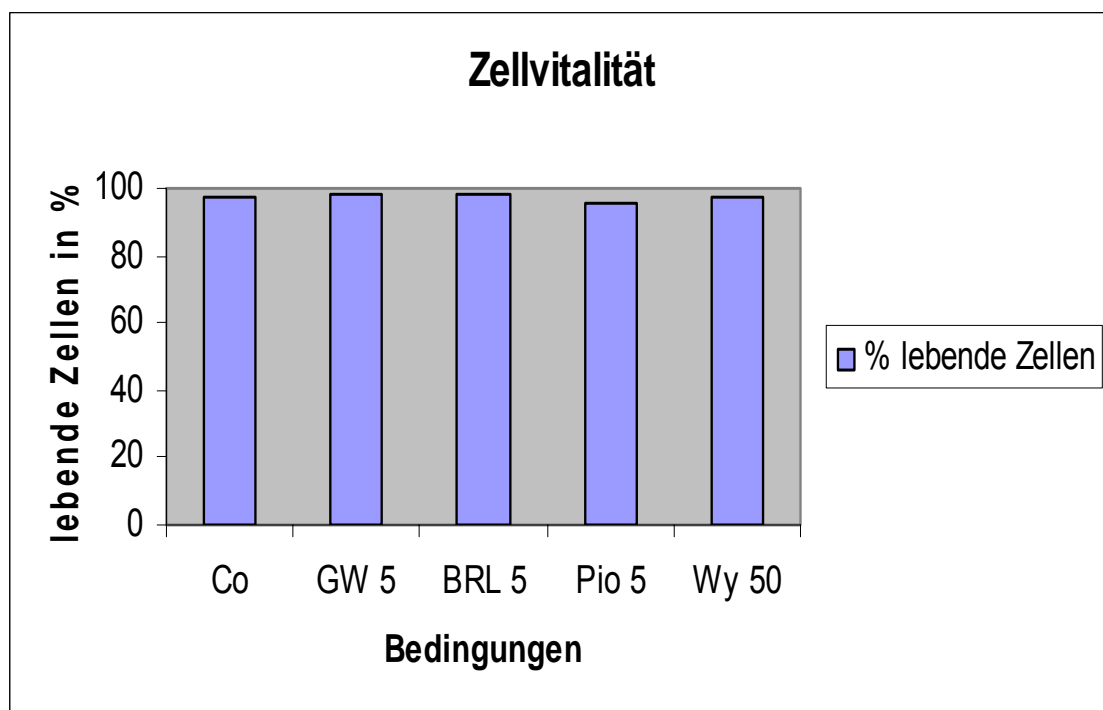


Abbildung 10: Repräsentatives Ergebnis der Vitalität CD4-positiver Lymphozyten nach dreistündiger Migration. Angaben in Prozent. Co (Kontrolle, nicht stimulierte Zellen), GW 5 (GW-1929, 5 $\mu$ mol/l), BRL 5 (Rosiglitazon, 5 $\mu$ mol/l), Pio 5 (Pioglitazon, 5 $\mu$ mol/l), Wy 50 (Wy-14643, 50 $\mu$ mol/l).

## **IV. Diskussion**

Die vorliegende Arbeit zeigt eine Inhibition der RANTES sowie SDF1 $\alpha$  induzierten CD4-positiven Zellmigration durch PPAR $\alpha$ -aktivierende Fibrate und PPAR $\gamma$ -aktivierende antidiabetisch wirksame Thiazolidinedione sowie des Nicht-Glitazon PPAR $\gamma$ -Aktivators GW-1929. Diese Daten legen nahe, dass die Substanzen frühe Schritte in der Atherogenese durch eine verminderte T4-Zellmigration in die arteriosklerotische Läsion beeinflussen könnten.

### **1. PPAR alpha**

Bereits frühere Arbeiten haben die PPAR $\alpha$ -Aktivatoren Fenofibrat und WY14643 etabliert. Beide besitzen eine hohe Bindungsaffinität, während sie selektiv mit PPAR $\alpha$  interagieren. Sie besitzen so gut wie keine Aktivität an anderen PPAR-Isoformen (Marx/Sukhova et al. 1999). Ihre Wirkung ist vielfältig. Im klinischen Alltag werden Fibrate vor allem zur Senkung erhöhter Triglycerid- und Cholesterinspiegel eingesetzt. (Mutschler et al. 2001). Neuere Studien, wie auch die vorliegende Arbeit, haben das Augenmerk auf andere Aktivitäten der PPAR $\alpha$ -Aktivatoren gelenkt. So wird PPAR $\alpha$  auch in Herz, Leber, Niere (Plutzky 2003), Muskel und Haut sowie von Monozyten/Makrophagen, B- und T-Lymphozyten (Angeli 2003) und humanen Endothelzellen (Marx/Sukhova et al. 1999) exprimiert. Die Wirkungsweisen, die sich im Laufe der Zeit aus diesen Erkenntnissen ergeben haben, sind vielfältig. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass PPAR $\alpha$ -Liganden die IL-1 $\beta$  induzierte IL-6 Sekretion hemmen können sowie die 6-keto-prostaglandin F $_{1\alpha}$  Produktion (Delerive et al. 2001; Plutzky 2003). In humanen Endothelzellen konnte nachgewiesen werden, dass die Expression des Zytokin-induzierten VCAM-1 Moleküls durch PPAR $\alpha$ -Aktivatoren gehemmt wird

(Marx/Sukhova et al. 1999; Rival et al. 2002). In humanen CD4-positiven Lymphozyten konnte eine Inhibition der  $\text{IFN}\gamma$ -Expression sowie eine reduzierte anti-CD3- induzierte  $\text{TNF}\alpha$ - und IL-2-Sekretion nachgewiesen werden (Marx et al. 2002; Marx et al. 2004). Alle diese Zytokine besitzen eine proinflammatorische Wirkung, die durch diese unterschiedlichen Angriffspunkte gesenkt werden kann. In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der  $\text{PPAR}\alpha$ -Agonist WY14643 konzentrationsabhängig die T4-Zellmigration hemmt. Ein Zustandekommen dieses Effekts durch Absterben der CD4-positiven Lymphozyten kann ausgeschlossen werden, da die Vitalität der Zellen, wie gezeigt, nicht signifikant beeinflusst wurde. Migrationshemmung durch  $\text{PPAR}\alpha$ -Agonisten konnten auch schon in einem Wundmodell gezeigt werden, Fenofibrat inhibiert die Endothelzellmigration in eine heilende Wunde (Varet et al. 2003).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Konzentrationen von WY14643 liegen zwischen  $1\mu\text{mol/l}$  und  $50\mu\text{mol/l}$  und damit verglichen mit anderen Studien deutlich niedriger. Die gängigen Konzentrationen für WY14643 liegen meist zwischen  $100\mu\text{mol/l}$  und  $250\mu\text{mol/l}$  (Jackson et al. 1999; Marx et al. 1998; Marx/Bourcier et al. 1999; Marx/Sukhova et al. 1999; Marx et al. 2002). Es wurden in der vorliegenden Arbeit solch niedrige Konzentrationen verwendet, da Experimente mit entsprechend höheren Konzentrationen des WY14643 eine starke Inhibition der T4-Zellmigration ohne sichtbare Konzentrationsabhängigkeit ergab. Durch die Senkung der Konzentrationen konnte eine Konzentrationsabhängigkeit nachgewiesen werden.

## **2. PPAR gamma**

Die antidiabetisch wirksamen Thiazolidinedione sind als PPAR $\gamma$ -Aktivatoren hoher Affinität bekannt. Auch der in der vorliegenden Arbeit verwendete PPAR $\gamma$ -Agonist GW1929 ist bereits als solcher bekannt und besitzt eine hohe Affinität gegenüber diesem Subtyp (Barbier et al. 2002). Ihre Wirkung ist wie die der PPAR $\alpha$ -Agonisten sehr vielfältig. In der Klinik werden die Thiazolidinedione bei Typ 2 Diabetikern eingesetzt, um die Insulin-Resistenz zu reduzieren (Joost 2001). Sie gelten generell als gut verträglich und sehr nebenwirkungsarm. Unter der Behandlung mit Troglitazon, einem weiteren PPAR $\gamma$ -Agonisten, kam es jedoch zu letal verlaufenden toxischen Leberschädigungen, so dass diese Substanz im März 2000 vom US-Markt genommen wurde. Trotz einzelner Berichte über einen Leberzellschaden unter Rosiglitazontherapie konnten entsprechende Studien keine signifikante Erhöhung der Transaminasen nachweisen (Matthaei et al. 2001).

Die Arbeiten der letzten Jahre haben zunehmend mehr Gewebe gefunden, die PPAR $\gamma$  exprimieren. So gehören dazu nicht nur Fettgewebe, Darm und die Gefäßwand mit Endothelzellen und vascular smooth muscle cells (VSMCs) sondern auch Monozyten/Makrophagen sowie B- und T-Lymphozyten (Angeli et al. 2003; Wijk van et al. 2004). Allein aus dieser Vielzahl von Geweben, die PPAR $\gamma$  exprimieren, lassen sich eine Reihe von Wirkungsweisen erahnen. Hsueh et al. 2001, fassen zusammen, was auch andere Arbeitsgruppen in Bezug auf das Gefäßsystem beobachten konnten: PPAR $\gamma$ -Liganden hemmen die Monozyten in ihrer Migration (Collins et al. 2001; Paceri et al. 2000) und senken ihre inflammatorische Aktivität, indem sie die Expression einer Reihe von proinflammatorischen Zytokinen hemmen (Barbier et al. 2002).

Sie vermindern die Anlagerung an die Endothelzellen (Jackson et al. 1999) und steigern den reversen Cholesteroltransport (Barbier et al. 2002; Ricote et al. 2004). In VSMCs hemmen sie das Wachstum, die Migration sowie die Matrix Metalloproteinase (MMP)-9-Produktion (Marx et al. 1998). Eine Senkung der Matrix Metalloproteinase (MMP)-9 konnten auch Marx et al. 2003, im Serum von Typ 2 Diabetikern mit koronarer Herzkrankheit unter Rosiglitazon Therapie nachweisen. In Endothelzellen hemmen PPAR $\gamma$ -Liganden ebenfalls das Wachstum, die Migration, die Expression des VCAM-1 (Barbier et al. 2002; Collins 2003; Jackson et al. 1999; Pasceri et al. 2000) sowie die Angiogenese (Marx et al. 2004).

Über die Wirkung der PPAR $\gamma$ -Liganden auf CD4-positive Lymphozyten gibt es bisher nur wenige Studien. Es konnte bereits beobachtet werden, dass PPAR $\gamma$ -Liganden in CD4-positiven Lymphozyten die anti-CD3 induzierte IL-2 (Clark et al. 2000) und TNF $\alpha$ -Sekretion reduzieren sowie die Expression von IFN $\gamma$  hemmen. Es konnte daraufhin nachgewiesen werden, dass diese Reduktion der Zytokine eine Auswirkung auf die proinflammatorische Aktivität der T-Lymphozyten gegenüber den humanen Monozyten sowie den Endothelzellen hat (Marx et al. 2002). In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die PPAR $\gamma$ -Liganden Pioglitazon und Rosiglitazon die Migration CD4-positiver Zellen hemmen. Ein Zustandekommen dieses beobachteten Effektes der Migrationshemmung durch ein Absterben der CD4-positiven Lymphozyten kann ausgeschlossen werden, da die Vitalität der Zellen, wie gezeigt, nicht wesentlich beeinflusst wurde. Die Hemmung der Migration lässt sich einfügen in eine Reihe von bereits gesehenen Migrationshemmungen anderer Zellen, die Auswirkung auf die Atherogenese haben.

Daten verschiedener Arbeitsgruppen legen nahe, dass Thiazolidinedione ihre Wirkung auch unabhängig von PPAR $\gamma$  ausüben können. Chawla et al. berichten, dass Thiazolidinedione sowohl bei Wildtyp-Makrophagen als auch bei Makrophagen ohne PPAR $\gamma$  die Expression proinflammatorischer Zytokine hemmen können. Daraus ergibt sich die Hypothese einer PPAR $\gamma$ -unabhängigen Beeinflussung. Unsere Daten zeigen, dass der spezifische PPAR $\gamma$ -Aktivator GW1929, ein Nicht-Thiazolidinedion, eine den Thiazolidinedionen ähnliche Hemmung auf die T4-Zellmigration hat. Daraus lässt sich schließen, dass der beobachtete Effekt PPAR $\gamma$  vermittelt ist.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Konzentrationen von Rosiglitazon (BRL) und Pioglitazon (Pio) liegen jeweils zwischen 0,1 $\mu$ mol/l und 5 $\mu$ mol/l. Andere vergleichbare Studien arbeiten mit Konzentrationen im Bereich von 1 $\mu$ mol/l bis 10 $\mu$ mol/l (Jackson et al. 1999; Marx et al. 2002). Es wurden in der vorliegenden Arbeit, wie bereits im Abschnitt „PPAR alpha“ besprochen, niedrigere Konzentrationen verwendet, da Experimente mit den entsprechend höheren Konzentrationen eine starke Inhibition der T4-Zellmigration ohne sichtbare Konzentrationsabhängigkeit ergab. Durch die Senkung der Konzentrationen konnte eine Konzentrationsabhängigkeit nachgewiesen werden. Physiologisch konnte beispielsweise eine Plasmakonzentration von Pioglitazon von 1-10 $\mu$ M nachgewiesen werden (Imamoto et al. 2004). Damit liegen die hier verwendeten Konzentrationen von Pioglitazon im Bereich des Physiologischen.

### **3. PPAR-Effekt in T-Zellen**

T-Lymphozyten sind die Träger der zellulären Immunität. Nach ihrer Aktivierung differenzieren sie zu Effektorzellen, sezernieren Zytokine und migrieren in das Pathogen enthaltene periphere Gewebe. Dies führt zu einer lokalen Entzündung (Andrian et al. 2000).

T-Zellen haben unter anderem eine Bedeutung in der Atherogenese. So werden sie in rupturierten Plaque zusammen mit Monozyten /Makrophagen gefunden (Plutzky 2003). Auch Ross 1999, berichtet, dass die Atherogenese durch Makrophagen und T-Lymphozyten beeinflusst wird. Die T-Zellen scheinen die Atherogenese durch proinflammatorische Zytokine zu fördern. Zu diesen zählen IL-2 sowie IFN- $\gamma$  (Frostedgård et al. 1999) und tumor necrosis factors (TNFs). Die Zytokine führen zu einer Plaque-Entwicklung durch Aktivierung der Endothelzellen und Modulation der Makrophagen- sowie VSMC-Aktivität. Dies sind wichtige Schritte im Zusammenspiel der Immunantwort und führen möglicherweise zu einem immer wiederkehrenden Zyklus von inflammatorischer Zellrekrutierung, Anheftung, Migration in die Gefäßwand und weiterer Zellaktivierung (Marx et al. 2002). Die Zytokinexpression wird, wie bereits besprochen, sowohl durch PPAR $\alpha$ - als auch PPAR $\gamma$ -Liganden inhibiert (Clark et al. 2000; Marx et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte ein inhibitorischer Effekt der PPAR-Liganden auf die Migration CD4-positiver Lymphozyten beobachtet werden. Diese Effekte der PPAR-Aktivatoren könnten so zu einer Unterbrechung des beschriebenen Kreislaufes führen und einen wichtigen Schritt in der Atherogenese unterbinden.



#### **4. PPAR-Effekt auf die Atherogenese**

Lange Zeit betrachtete man nur die Hypercholesterinämie als Ursache der arteriosklerotischen Plaque-Entstehung. Zunehmend wird jedoch die Atherogenese auch als eine inflammatorische Erkrankung gesehen (Binder et al. 2002; Libby 2002; Steinberg 2002). Als solche ist die Entstehung charakterisiert durch das Vorhandensein von inflammatorischen Zellen wie Monozyten/Makrophagen und T-Zellen, die proinflammatorische Zytokine produzieren, sowie die Aktivierung der VSMCs (Marx 2002) und die Aktivierung von Bindungsproteinen auf den Endothelzellen (Plutzky 2003). Wie bereits beschrieben, sind PPAR-Aktivatoren in der Lage, viele dieser Prozesse zu inhibieren und damit wichtige Schritte in der Atherogenese zu unterbinden. Es gibt auch Studien, die proinflammatorische Effekte belegen (Tontonoz et al. 1998). In Anbetracht der vielen Daten, die für eine antiinflammatorische Wirkung der PPAR Aktivatoren sprechen, kann man jedoch von einem positiven Effekt im Ganzen ausgehen.

Weiterhin entsteht die Frage, ob die in vitro gewonnenen Daten auch eine Relevanz in vivo besitzen. So konnte in einer Studie an Typ 2 Diabetikern unter Rosiglitazon-Therapie eine Verminderung inflammatorischer Marker wie CRP, IL-6, MMP-9 und der Leukozyten nachgewiesen werden (Haffner et al. 2002). In einer weiteren Studie an Typ 2 Diabetikern unter Pioglitazon-Therapie konnte eine Reduktion der Intima-Media-Dicke gezeigt werden, einem nichtinvasiven Marker für das Fortschreiten der Arteriosklerose (Koshiyama et al. 2001). Auch bei Nicht-Diabetikern unter Rosiglitazon Therapie konnte eine Verringerung der Intima-Media-Dicke beobachtet werden (Sidhu et al. 2004). Diese Daten sprechen dafür, dass sich die in vitro beobachteten Effekte auch in vivo übertragen lassen. In einer Studie an Mäusen fiel jedoch auf, dass

PPAR $\gamma$ -Agonisten die Arteriosklerose-Entstehung bei männlichen Mäusen ohne Low density lipoprotein (LDL)-Rezeptor wesentlich stärker als bei weiblichen inhibierten (Li et al. 2000). Ein Geschlechtsunterschied wie hier beschrieben, wurde bei den Typ 2 Diabetikern unter Pioglitazon Therapie nicht signifikant (Koshiyama et al. 2001). Es fehlen weitere Studien, um eine solche geschlechtsspezifische Wirkung gänzlich auszuschließen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die vorliegende Studie eine weitere Funktion der PPAR-Aktivatoren aufzeigen konnte und somit das Bild der PPARs erweitert. Im Ganzen sieht es so aus, als hätten PPAR-Aktivatoren einen hemmenden Einfluss auf die Atherogenese. Mit den Fibraten und Thiazolidinedionen stehen mögliche neue Medikamente zur Bekämpfung der Arteriosklerose zur Verfügung, die schon heute unter anderer Indikation in der Klinik Anwendung finden und deren Nebenwirkungsprofil bekannt ist. Es bleiben jedoch noch etliche offene Fragen, die es in weiteren Studien zu klären gilt.

## **V. Zusammenfassung**

Die Arteriosklerose wird heute zunehmend als inflammatorische Erkrankung gesehen, die charakterisiert ist durch das Vorhandensein von inflammatorischen Zellen wie Monozyten/Makrophagen und T-Lymphozyten. Die proinflammatorische Aktivität der Zellen kann durch Aktivatoren des Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), einem nukleären Hormonrezeptor, moduliert werden.

Die hier vorliegende Arbeit zeigt eine Hemmung der durch RANTES (Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) beziehungsweise SDF-1 $\alpha$  (Stromal cell-Derived Factor 1 Alpha) induzierten Migration humaner CD4-positiver Lymphozyten in der modifizierten Boydenkammer durch Aktivatoren des PPARs. Sowohl durch den PPAR alpha ( $\alpha$ ) -Liganden Wy14643 (4-Chloro-6-(2,3-xylidiono)-2-pyrimidinylthio acetic acid), als auch durch die PPAR gamma ( $\gamma$ ) -Liganden Rosiglitazon (BRL) und Pioglitazon (Pio), beides Thiazolidinedione, und auch durch GW1929 ([N-12-Benoylphenyl)-L-tyrosine PPAR $\gamma$  Agonist]), ein Nicht-Glitazon, erfolgte eine Inhibition der Migration. Die Vitalität der Zellen blieb in allen Experimenten unbeeinflusst.

Studien der letzten Jahre erweiterten die Erkenntnisse über PPAR-Aktivatoren, so dass im Ganzen von einer anti-inflammatorischen Wirkung ausgegangen werden kann. Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen eine weitere anti-atherogene Funktion der PPAR-Aktivatoren auf und ergänzen unser Bild von deren Funktion. Mit den Fibraten und den Thiazolidinedionen stehen zwei Medikamentengruppen zur Verfügung, die bereits in der Klinik eingesetzt werden. Möglicherweise sind sie eine

neue Alternative zur Modulation der Arteriosklerose. Zur endgültigen Klärung der PPAR-Effekte bedarf es allerdings noch weiterer Studien.

## **VI. Literaturverzeichnis**

1. 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)
2. Andrian UH, Mackay CR: T-cell function and migration: Two sides of the same coin. N Engl J Med 343: 1020-1034 (2000)
3. Angeli V, Hammad H, Staels B, Capron M, Lamprecht BN, Trottein F: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  Inhibits the Migration of Dendritic Cells: Consequences for the Immune response. The Journal of Immunology 170: 5295-5301 (2003)
4. Barbier O, Torra IP, Duguay Y, Blanquart C, Fruchart J-C, Glineur C, Staels B: Pleiotropic Actions of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Lipid Metabolism and Atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 22: 717-726 (2002)
5. Binder CJ, Chang M-K, Shaw PX, Miller YI, Hartvigsen K, Dewan A, Witztum JL: Innate and acquired immunity in atherogenesis. Nat Med 8: 1218-1226 (2002)
6. Blades MC, Manzo A, Ingegnoli F, Taylor PR, Panayi GS, Irjala H, Jalkanen S, Haskard DO, Perretti M, Pitzalis C: Stromal Cell-Derived Factor 1 (CXCL 12) Induces Human Cell

Migration into Human Lymph Nodes Transplanted into SCID Mice. *The Journal of Immunology* 168: 4308-4317 (2002)

7. Chawla A, Barak Y, Nagy L, Liao D, Tontonoz P, Evans RM: PPAR- $\gamma$  dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat Med* 7: 48-52 (2001)
8. Clark RB, Bishop-Bailey D, Estrada-Hernandez T, Hla T, Puddington L, Padula SJ: The Nuclear Receptor PPAR $\gamma$  and Immunoregulation: PPAR $\gamma$  Mediates Inhibition of Helper T Cell Responses. *The Journal of Immunology* 164: 1364-1371 (2000)
9. Collins AR: Pleiotropic vascular effects of PPAR $\gamma$  ligands. *Drug News Perspect* 16: 197-204 (2003)
10. .. Collins AR, Meehan WP, Kintscher U, Jackson S, Wakino S, Noh G, Palinski W, Hsueh WA, Law RE: Troglitazone Inhibits Formation of Early Atherosclerotic Lesions in Diabetic and Nondiabetic Low Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 365-371 (2001)
11. .. Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr.: Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 251: 788-791 (1991)
12. .. Delerive P, Fruchart J-C, Staels B: Eurosterone meeting, Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *Journal of Endocrinology* 169: 453-459 (2001)

13. .. Eppinger T: Immunsystem. In: Renz-Polsterer H, Braun J (Hrsg.) Basislehrbuch Innere Medizin, 2. Auflage, Urban und Fischer, München Jena, S. 329-391 (2001)
14. .. Frostegård J, Ulfgren A-K, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, Hansson GK: Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis* 145: 33-43 (1999)
15. .. Hach-Wunderle: Arterielle Gefäßkrankheiten. In: Renz-Polsterer H, Braun J (Hrsg.) Basislehrbuch Innere Medizin, 2. Auflage, Urban und Fischer, München Jena, S.191-194 (2001)
16. .. 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 Typ 2 Diabetes Mellitus. *Circulation* 106: 679-684 (2002)
17. .. Hansson GK, Jonasson L, Lojsthed B, Stemme S, Kocher O, Gabbiani G: Localization of T lymphocytes and macrophages in fibrous and complicated human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 72: 135-141 (1988)
18. .. Haynes BF, Fauci AS: Disorders of the immune system. In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL (Hrsg.) *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 15th Edition, McGraw-Hill, New York, S. 1805-1839 (2001)

19. .. Hoffmann-La Roche AG: Atherosklerose. In: Hoffmann-La Roche AG und Urban und Fischer (Hrsg.) Roche Lexikon Medizin, 4. Auflage, Urban und Fischer, München, S.129 (1998)
20. .. Hsueh WA, Law RE: PPAR $\gamma$  and Arteriosklerosis Effects on cell growth and movement. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 1891-1895 (2001)
21. .. Imamoto E, Yoshida N, Uchiyama K, Kuroda M, Kokura S, Ichikawa H, Naito Y, Tanigawa T, Yoshikawa T: Inhibitory effect of pioglitazone on expression of adhesion molecules on neutrophils and endothelial cells. *Biofactors* 20: 37-47 (2004)
22. .. Jackson SM, Parhami F, Xi X-P, Berliner JA, Hsueh WA, Law RE, Demer LL: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Activators Target Human Endothelial Cells to Inhibit Leukocyte-Endothelial Cell Interaction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 2094-2104 (1999)
23. .. Joost H-G: Diabetes mellitus. In: Lemmer B, Brune K (Hrsg.) Pharmakotherapie Klinische Pharmakologie, 11. Auflage, Urban und Fischer, München Jena, S. 362-372 (2001)
24. .. Kawai T, Seki M, Hiromatsu K, Eastcott JW, Watts GFM, Sugai M, Smith DJ, Porcelli SA, Taubman MA: Selective Diapedesis of Th1 Cells Induced by Endothelial Cell RANTES. *The Journal of Immunology* 163: 3269-3278 (1999)



25. .. Koshiyama H, Shimono D, Kuwamura N, Minamikawa J, Nakamura Y: Inhibitory Effect Of Pioglitazone On Carotid Arterial Wall Thickness In Typ 2 Diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86: 3452-3456 (2001)
26. .. Kuroiwa T, Schlimgen R, Illei GG, McInnes IB, Boumpas DT: Distinct T Cell/Renal Tubular Epithelial Cell Interactions Define Differential Chemokine Production: Implications for Tubulointerstitial Injury in Chronic Glomerulonephritides. *The Journal of Immunology* 164: 3323-3329 (2000)
27. .. Li AC, Brown KK, Silvestre MJ, Willson TM, Palinski W, Glass CK: Peroxisome proliferators-activated receptor  $\gamma$  ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 106: 523-531 (2000)
28. .. Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr., Libby P: An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler Thromb* 13: 197-204 (1993)
29. .. Libby P: The Pathogenesis of Atherosclerosis. In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL (Hrsg.) *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 15th Edition, McGraw-Hill, New York, S. 1377-1382 (2001)
30. .. Libby P, Geng YJ, Aikawa M, Schoenbeck U, Mach F, Clinton SK, Sukhova GK, Lee RT: Macrophages and atherosclerotic

plaque stability. *Curr Opin Lipidol* 7: 330-335 (1996)

31. ... Libby P, Ridker PM, Maseri A: Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation* 105: 1135-1143 (2002)
32. ... Libby P, Ridker PM: Novel inflammatory markers of coronary risk: theory versus practice. *Circulation* 100: 1148-1150 (1999)
33. ... Libby P: Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 104: 365-372 (2001)
34. ... Libby P: Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420: 868-874 (2002)
35. ... Marx N, Bourcier T, Sukhova GK, Libby P, Plutzky J: PPAR $\gamma$  Activation in Human Endothelial Cells Increases Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 Expression PPAR $\gamma$  as a Potential Mediator in Vascular Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 19: 546-551 (1999)
36. ... Marx N, Duez H, Fruchart J-C, Staels B: Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Atherogenesis Regulators of Gene Expression in Vascular Cells. *Circ Res* 94: 1168-1178 (2004)
37. ... Marx N, Froehlich J, Siam L, Ittner J, Wierse G, Schmidt A, Scharnagl H, Hombach V, Koenig W: Antidiabetic PPAR $\gamma$ -Activator Rosiglitazone Reduces MMP-9 Serum Levels in Type 2 Diabetic Patients With Coronary Artery Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 283-288 (2003)

38. .. 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 (2002)
39. .. 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. *Circulation Research* 83: 1097-1103 (1998)
40. .. Marx N, Sukhova GK, Collins T, Libby P, Plutzky J: PPAR $\alpha$  Activators Inhibit Cytokine-Induced Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression in Human Endothelial Cells. *Circulation* 99: 3125-3131 (1999)
41. .. Marx N: PPAR $\gamma$  and Vascular Inflammation Adding Another Piece to the Puzzle. *Circ Res* 91: 373-374 (2002)
42. .. Matthaei S, Stumvoll M, Häring H-U: Thiazolidinedione (Insulinsensitizer): Neue Aspekte in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2. *Dt Arztebl* 98: A912-918 (2001)
43. .. Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M: Mutschler Arzneimittelwirkungen Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart. 8. Auflage: 517-519 (2001)

44. .. Nanki T, Lipsky PE: Cutting Edge: Stromal Cell-Derived Factor-1 Is a Costimulator for CD4+ T Cell Activation. The Journal of Immunology 164: 5010-5014 (2000)
45. .. Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, Palinski W: Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. J Clin Invest 100: 2680-2690 (1997)
46. .. Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, Wilcox JN: Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. J Clin Invest 88: 1121-1127 (1991)
47. .. Pasceri V, Wu HD, Willerson JT, Yeh ETH: Modulation of Vascular Inflammation In Vitro and In Vivo by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  Activators. Circulation 101: 235-238 (2000)
48. .. Pelletier AJ, Laan an der LJW, Hildbrand P, Siani MA, Thompson DA, Dawson PE, Torbett BE, Salomon DR: Presentation of chemokine SDF-1 $\alpha$  by fibronectin mediates directed migration of T cells. Blood 96: 2682-2690 (2000)
49. .. Plutzky J: The Potential Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors on Inflammation in Typ 2 Diabetes

- Mellitus and Arteriosclerosis. *Am J Cardiol* 92: 34J-41J (2003)
50. .. Raines EW, Ross R: Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *Br Heart J* 69: S30-37 (1993)
51. .. Ricote M, Villedor AF, Glass CK: Decoding Transcriptional Programs Regulated by PPARs and LXRs in the Macrophage: Effects on Lipid Homeostasis, Inflammation, and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 230-239 (2004)
52. .. Rival Y, Benéteau N, Taillandier T, Pezet M, Dupont-Passelaigue E, Patoiseau J-F, Junquéro D, Colpaert FC, Delhon A: PPAR $\alpha$  and PPAR $\delta$  activators inhibit cytokine-induced nuclear translocation of NF- $\kappa$ B and expression of VCAM-1 in EAhy926 endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 435: 143-151 (2002)
53. .. Ross R: Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340: 115-126 (1999)
54. .. Serrador JM, Nieto M, Sánchez-Madrid F: Cytoskeletal rearrangement during migration and activation of T lymphocytes. *Trends Cell Biol* 9: 228-233 (1999)
55. .. Sidhu JS, Kaposzta Z, Markus HS, Kaski JC: Effect of Rosiglitazone on Common Carotid Intima-Media Thickness Progression in Coronary Artery Disease Patients Without Diabetes Mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 930-934

(2004)

56. ... Steinberg D: Atherogenesis in perspective: Hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nat Med* 8: 1211-1217 (2002)
57. ... Stemme S, Faber B, Holm J, Wiklund O, Witztum JL, Hansson GK: T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 3893-3897 (1995)
58. ... Stemme S, Hansson GK: Immune mechanisms in atherogenesis. *Ann Med* 26: 141-146 (1994)
59. ... Taguchi M, Sampath D, Koga T, Castro M, Look DC, Nakajima S, Holtzman MJ: Patterns for RANTES Secretion and Intercellular Adhesion Molecule 1 Expression Mediate Transepithelial T cell Traffic Based on Analyses In Vitro and In Vivo. *J. Exp. Med* 187: 1927-1940 (1998)
60. ... Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM: PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 93: 241-252 (1998)
61. ... Varet J, Vincent L, Mirshahi P, Pille JV, Legrand E, Opolon P, Mishal Z, Soria J, Li H, Soria C: Fenofibrate inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Cell Mol Life Sci* 60: 810-819 (2003)
62. ... Wang JM, Sica A, Peri G, Walter S, Padura IM, Libby P, Ceska

M, Lindley I, Colotta F, Mantovani A: Expression of monocyte chemotactic protein and interleukin-8 by cytokine-activated human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* 11: 1166-1174 (1991)

63. .. Wijk van JPH, Rabelink TJ: PPAR $\gamma$  Agonists: Shifting Attention from the Belly to the Heart? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 798-800 (2004)