

Abteilung Innere Medizin II

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. V. Hombach

Regulation der Expression der Rezeptoren für advanced glycation end products (RAGE) auf humanen Monozyten

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

vorgelegt von
Daniela Rösch
Langenau
2005

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Nikolaus Marx

2. Berichterstatter: PD Dr. Volker Ellenrieder

Tag der Promotion: 20. Juli 2006

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis	3
2. Abkürzungsverzeichnis	5
3. Einleitung	7
3.1 Arteriosklerose und Diabetes mellitus	7
3.2 Die Interaktion von AGE und RAGE	9
3.3 Monozyten und Zytokine	12
3.4 Fragestellung	13
4. Material	15
4.1 Substanzen und Lösungen	15
4.2 Antikörper	17
4.3 Geräte und Verbrauchsmaterial	18
5. Methoden	19
5.1 Isolation von Monozyten	19
5.2 Zellzählung	20
5.3 Stimulation der Zellen	20
5.3.1 Zeitabhängigkeit	20
5.3.2 Konzentrationsabhängigkeit	20
5.3.3 Überstand-Experiment	21
5.3.4 Inkubation	21
5.4 Ernten der Monozyten und Lyse der Zellen	21
5.5 Bestimmung der Proteinkonzentration	22
5.6 Western Blot	22
5.6.1 Herstellung eines nicht-denaturierenden Polyacrylamidgels	22
5.6.2 Elektrophorese	23
5.7 Blotten	23
5.8 Markierung der RAGE-Rezeptoren mittels spezifischer Antikörper	24
5.9 Chemolumineszenz	24
5.10 Stripping	25
5.11 Nachweis von α -Tubulin	25
5.12 Densitometrie	25
5.13 Statistik	26

6. Ergebnisse	27
6.1 TNF- α fördert zeitabhängig die Expression von RAGE-Rezeptoren	27
6.2 TNF- α steigert konzentrationsabhängig die Expression von RAGE-Rezeptoren	29
6.3 Zytokine aus den Überständen von S100 stimulierten Monozyten induzieren eine gesteigerte RAGE-Expression	31
7. Diskussion	33
7.1 Zytokine	33
7.2 RAGE-Expression	34
7.3 Circulus vitiosus der Zellaktivierung	38
7.4 Bedeutung für die Arteriosklerose beim Diabetiker	39
8. Zusammenfassung	41
9. Literaturverzeichnis	42
10. Danksagung	50

2. Abkürzungsverzeichnis

AGE	advanced glycation end product
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
Co	Kontrolle
Co-SN	Kontrollzellen, inkubiert mit Überstand
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution, modified
HRP	horse radish peroxidase
Il-1	Interleukin-1
Il-6	Interleukin-6
kD	Kilodalton
LDL	low density lipoprotein
M	Einheit der molekularen Masse (1 mol x 1 ⁻¹)
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
n	Fallzahl
NaCl	Natriumchlorid
neg. Co	Negativkontrolle
NFκB	Nuklear Factor-kappaB
NP 40	Nonyl-phenoxy polyethoxy ethanol 40
p	Signifikanzniveau
PBS	phosphate buffered saline
pH	potentia hydrogenii (Maßeinheit für die Konzentration von Wasserstoffionen)
PMSF	Phenyl-Methanesulfonyl fluoride
PS	Penicillin/Streptomycin
RAGE	Receptor for advanced glycation end products
RPM	Rounds per minute

SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	standard error of the mean
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	N, N, N', N' - Tetramethylethylendiamin
TF	Tissue factor
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
Tween 20	Polyoxyethylenesorbitan monolaurate
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1

3. Einleitung

3.1 Arteriosklerose und Diabetes mellitus

Diabetes mellitus ist eine Störung des Glukosemetabolismus, die fortschreitend die Funktion aller Organsysteme beeinträchtigt, vor allem durch die Entwicklung von sekundären Komplikationen. Unter diesen Komplikationen ist die beschleunigte Entstehung von Arteriosklerose der größeren zentralen und peripheren Arterien als Haupttodesursache bei sowohl Typ-1 als auch Typ-2 Diabetes zu nennen [10].

Arteriosklerose ist ein entzündlicher Prozess in der Gefäßwand. Er verläuft über Jahre in verschiedenen Stadien, in denen Entzündungszellen wie Monozyten, Makrophagen und T-Zellen sowie inflammatorische Mediatoren wie Zytokine, Wachstumsfaktoren und Chemokine involviert sind [56, 36, 38].

Initiales Stadium der Atherogenese ist die sogenannte endotheliale Dysfunktion. Hierbei handelt es sich um eine Störung der funktionalen Integrität sowie um eine erhöhte Permeabilität des Endothels, so dass Lipoproteine und Plasmakomponenten in die Gefäßwand insudieren können [45]. Eine erhöhte Expression von endothelialen und leukozytären Adhäsionsmolekülen führt zu gesteigerter Adhäsion und Einwanderung von Monozyten und T-Lymphozyten [33, 48, 16]. Es konnte gezeigt werden, dass hohe Glukosespiegel die Expression dieser Adhäsionsmoleküle induzieren und so die Leukozytenadhäsion an das Endothel begünstigen [18]. Die Einwanderung mononukleärer Zellen in die Gefäßwand wird durch eine Gruppe chemotaktisch wirksamer Proteine, so genannte Chemokine gesteuert, die aus aktiviertem Endothel und Zellen des Subendotheliums freigesetzt werden [39]. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Rekrutierung von Monozyten durch das Chemokin monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) vermittelt wird [21]. Die Bildung von MCP-1 kann in humanen Endothelzellen durch AGEs (advanced glycation end products) induziert werden, so dass von einer verstärkten

Monozytenrekrutierung bei Diabetikern ausgegangen werden muss [63]. Darüber hinaus liegt bei Diabetikern eine verstärkte Expression von Gewebsthromboplastin (Tissue Factor, TF) vor, welche die Thrombogenität der Zellen verstärkt [8, 25, 27]. In vivo führt die TF-Expression der Monozyten zur Ansammlung von Fibrin in der Gefäßwand und zu Hyperkoagulabilität [71, 24]. Dies kann zur Formation von Thromben in arteriosklerotischen Läsionen führen und kann schließlich in einer Gefäßobstruktion resultieren [25]. Fibrin und seine Abbauprodukte stimulieren die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten [26, 64]. Diese stellen wichtige Komponenten der arteriosklerotischen Läsionen dar. In Folge der endothelialen Dysfunktion kommt es zu einer veränderten Vasoreaktivität, sowie zu einer Verminderung des vasoprotektiven Stickstoffmonoxids [4].

In der nächsten Phase der Arteriosklerose bilden sich sog. Fatty-Streak-Formationen in der Gefäßwand. Da das Endothel vermehrt durchlässig für Plasmaproteine ist, akkumuliert LDL (low density lipoprotein) im subendothelialen Raum und wird oxidiert. Die in die Gefäßwand eingewanderten Monozyten können modifizierte Lipoproteine über sogenannte Scavenger-Rezeptoren aufnehmen. Dadurch verwandeln sie sich in lipidspeichernde Schaumzellen. Durch diesen Differenzierungsprozess kommt es zur Aktivierung der Monozyten und zur vermehrten Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie z.B. TNF- α , Il-1, Il-6 und Wachstumsfaktoren [42]. Die aus Monozyten und T-Zellen freigesetzten Zytokine führen wiederum zur Aktivierung anderer Gefäßwandzellen, so dass der Prozess der Leukozytenrekrutierung und Plaqueentwicklung weiter fortschreitet. Darüber hinaus sind diese Mediatoren dafür verantwortlich, dass glatte Gefäßmuskelzellen aus ihrer ursprünglichen Umgebung, der Tunica media in die Tunica intima einwandern und proliferieren [53].

Durch weitere Lipidansammlung, Apoptose, Zelltod und durch verstärkte proteolytische Aktivität kommt es zur Ausbildung eines nekrotischen Lipidkerns der Plaque und es entstehen fortgeschrittene Läsionen.

Durch eine schützende fibröse Kappe aus glatten Gefäßmuskelzellen und extrazellulärer Matrix wird der Lipidkern vom zirkulierenden Blut getrennt. Diese sogenannte stabile Plaque kann in eine instabile Plaque übergehen, die durch einen ausgedehnten nekrotischen Lipidkern, eine große Zahl von Schaumzellen und eine dünne fibröse Kappe gekennzeichnet ist [37]. Zytokine tragen zur erhöhten Fragilität der fibrösen Kappe eines Plaques dadurch bei, dass sie zu einer verminderten Synthese der extrazellulären Matrixbestandteile Kollagen und Elastin führen [1] und dass sie Makrophagen und Schaumzellen dahingehend beeinflussen, matrixdegradierende Enzyme, z.B. Matrixmetalloproteinasen, freizusetzen, welche die extrazelluläre Matrix der Kappe abbauen [35].

Fortgeschrittene arteriosklerotische Läsionen von Patienten mit Diabetes mellitus weisen im Vergleich zu Nichtdiabetikern einige histologische Besonderheiten auf, die zur erhöhten Inzidenz akuter Koronarsyndrome bei diesen Patienten beitragen. Insgesamt sind die arteriosklerotischen Plaques diabetischer Patienten durch eine vermehrte Instabilität, einen erhöhten nekrotischen Lipidanteil und somit erhöhte Fragilität und Thrombogenität, und eine größere Anzahl von Makrophagen und Schaumzellen gekennzeichnet. Dies wiederum bedeutet einen erhöhten Spiegel an Matrixmetalloproteinasen im Vergleich zum Nichtdiabetiker [41]. Durch die Einwirkung von Scherkräften kann es zur Ruptur der dünnen fibrösen Kappe und somit zur Ausbildung von Thromben kommen. Das akute Koronarsyndrom mit instabiler Angina pectoris oder akutem Myokardinfarkt stellt das klinische Korrelat einer solchen Plaqueruptur dar [37].

3.2 Die Interaktion von AGE und RAGE

Das erhöhte Risiko bei Patienten mit Diabetes mellitus besteht in dem Zusammenspiel von Hyperglykämie, Hyperinsulinämie, Dyslipidämie, endothelialer Dysfunktion und Veränderungen des Gerinnungssystems [6].

Neben dieser Vielzahl metabolischer Störungen finden sich bei Diabetikern aufgrund des erhöhten Blutzuckerspiegels vermehrt nicht-enzymatisch glykierte Endprodukte sogenannte advanced glycation end products (AGEs). Sie stellen einen entscheidenden Stimulus für die Entstehung arteriosklerotischer Gefäßveränderungen dar und wirken durch ihre Interaktion mit speziellen Rezeptoren für advanced glycation end products (RAGE) in vaskulären Zellen atherogen [62, 19]. Indem sie über bestimmte Signalwege die Induktion proinflammatorischer Gene aktivieren, fördern sie den Prozess der Atherogenese. Im Tierexperiment führt die Unterbrechung der AGE-RAGE-Interaktion zu einer signifikanten Verminderung der Arteriosklerose im atherogenen Mausmodell [51]. AGEs entstehen durch nicht-enzymatische Reaktionen von reduzierenden Zuckern mit freien Aminogruppen in Makromolekülen [46]. Glucose und andere reduzierende Zucker in der offenen Aldehydform reagieren mit freien N-terminalen und/oder ϵ -ständigen Aminogruppen in Proteinen [49]. AGE - Modifikationen können auch an Lipiden [14, 15] und Nukleinsäuren [12, 22, 50] auftreten. Die entstehenden Schiff'schen Basen werden innerhalb kurzer Zeit zu stabileren, aber noch reversiblen Amadoriprodukten umgebildet. Durch Oxidation des Amadori-Produkts, Dehydrierung sowie Eliminations- und Kondensationsreaktionen entstehen letztlich irreversibel quervernetzte Komplexe, die Protease-resistent und nur noch schlecht abbaubar sind [20]. Von allen natürlich vorkommenden Zuckern besitzt Glukose die geringste Glykierungsgeschwindigkeit, während intrazelluläre Zucker wie Fruktose, Threose, Glukose-6-Phosphat und Glycerolaldehyd-3-Phosphat viel schneller AGEs bilden [5, 66, 65]. Eine Akkumulation von AGE-Proteinen wird während des normalen Alterungsprozesses beobachtet [72] und tritt in verstärktem Maße bei Patienten mit Diabetes mellitus, Urämie und Alzheimer-Demenz auf [46, 9]. Abgelagerte AGEs fördern die Entstehung von Arteriosklerose über unterschiedliche Wege: Sie führen über eine AGE-Formation an der extrazellulären Matrix zu einem Elastizitätsverlust und einer Verengung des Gefäßlumens [9, 58]. Sie inaktivieren Stickstoffmonoxid und verhindern so die vasodilatative Gefäßreaktion [13].

Außerdem induzieren AGEs die Expression von Endothelin-1 und verursachen damit eine Änderung der Endothelfunktion in Richtung Vasokonstriktion [52]. HbA_{1c} ist der bekannteste Vertreter der AGEs und ist ein Indikator für lang andauernde Hyperglykämie [30, 40, 70].

AGEs können an verschiedene Zelloberflächenrezeptoren binden, wobei nur die Bindung an einen spezifischen Rezeptor (receptor for advanced glycation end products; RAGE) intrazelluläre Signalmechanismen aktiviert und so die proinflammatorischen AGE-Effekte mediiert [63].

RAGEs sind 35 kD Proteine und Mitglieder der Immunoglobulin-Superfamilie von Zelloberflächenmolekülen. Ihre extrazelluläre Domäne besteht aus einer V-Typ-Region und zwei C-Typ-Regionen, danach folgt eine transmembrane Domäne und ein kurzer zytosolischer Rest, der intrazelluläre Proteine binden kann [47]. Sie können von Endothelzellen, Gefäßmuskelzellen, mononukleären Zellen, T-Lymphozyten, Mesangialzellen und Neuronen [11] exprimiert werden.

Die Aktivierung eines RAGE-Rezeptors durch Bindung eines AGE führt zu intrazellulärem oxidativem Stress. Als Folge dieses vermehrten oxidativen Stresses wird der Transkriptionsfaktor Nuklear Factor-kappaB (NFκB) aktiviert [2, 7, 8, 43, 44, 61, 69, 73]. So führt eine Aktivierung von RAGEs über eine mehrere Tage andauernde Aktivierung des NFκB zur Expression proinflammatorischer und prokoagulatorischer Gene, wie Adhäsionsmoleküle (z.B. VCAM-1), Chemokine oder Gewebsthromboplastin (TF). Dadurch wird sowohl die Entstehung und Ausbildung arteriosklerotischer Läsionen gefördert [60, 61] als auch das dynamische Gleichgewicht der endothelialen Gerinnung in Richtung des prokoagulatorischen Zustandes verschoben [17].

Eine Aktivierung von RAGE kann neben AGEs auch von proinflammatorischen Peptiden der S100/Calgranulin Familie ausgeführt werden. Hierbei handelt es sich um Moleküle, die von polymorphkernigen Leukozyten freigesetzt werden und im Rahmen chronisch-entzündlicher Prozesse akkumulieren [23].

Bei Endothelzellen besteht eine basale RAGE-Expression, die durch Stimulation der Zellen mit proatherogenen Substanzen wie AGEs oder TNF-α verstärkt werden kann [11, 67, 34]. So veranlassen Zytokine durch RAGE-Induktion eine

Aktivierung der Zelle und führen weiterhin dazu, dass die Interaktion von AGE/RAGEs diese Induktion im Sinne einer Aktivierungsspirale fortsetzt [46]. Dies wird am Beispiel des Transkriptionsfaktors NF κ B sichtbar.

Die Kombination der komplexen metabolischen Störung bei Diabetikern sowie die AGE/RAGE-Interaktion bestimmen in entscheidendem Maße die rasche Entwicklung der Gefäßmanifestationen und scheinen den Verlauf der Atherogenese bei diesen Patienten entscheidend zu beeinflussen [70]. Obwohl RAGE nicht mit dem initialen Mangel bzw. der Resistenz von Insulin und den damit einhergehenden Störungen des Glukosemetabolismus verbunden zu sein scheint, erlaubt ihm die Bindung mit AGEs oder S100 als Progressionsfaktor der Atherogenese zu wirken.

3.3 Monozyten und Zytokine

Im Verlauf der Atherogenese nehmen Monozyten eine Schlüsselfunktion in der Entwicklung der arteriosklerotischen Läsionen ein und sind für die Bildung der Entzündungsmediatoren TNF- α und Interleukin-6 verantwortlich. Diese Zytokine nehmen Einfluss auf unterschiedliche Zellen der Gefäßwand und tragen somit zum Entzündungsprozess bei. Patienten mit Diabetes mellitus haben erhöhte Serumspiegel an TNF- α und Interleukin-6 und reflektieren unter Umständen dadurch die entzündlichen Vorgänge in ihrer Gefäßwand. Darüber hinaus scheinen die Monozyten bei Diabetikern in einem dauerhaft aktivierten Zustand zu sein verglichen mit Nichtdiabetikern. So können bei Patienten mit Diabetes mononukleäre Zellen gefunden werden, die dauerhaft aktiviertes NF κ B aufweisen. Dieses Phänomen wird auf die AGE-bedingte RAGE-Stimulation zurückgeführt [46].

3.4 Fragestellung

In verschiedenen Studien konnte bislang gezeigt werden, dass proinflammatorische Mediatoren einen großen Einfluss auf die Entstehung arteriosklerotischer Läsionen haben. Vor allem Endothelzellen reagieren auf eine vermehrte Zytokinkonzentration durch eine gesteigerte Expression von Zelloberflächenrezeptoren.

Da Monozyten und Makrophagen bei der Arterioskleroseentstehung eine Schlüsselrolle einnehmen, stellt sich die Frage, ob die proinflammatorischen Effekte ebenfalls Auswirkungen auf Monozyten und deren RAGE-Rezeptoren haben und ob sich diese Rezeptoren durch Zytokine regulieren lassen.

Hierzu soll untersucht werden, ob das proinflammatorische Zytokin TNF- α in steigenden Konzentrationen die Expression von RAGE-Rezeptoren auf der Oberfläche von humanen Monozyten beeinflussen kann.

Darüber hinaus ist zu klären, nach welcher Inkubationszeit mit TNF- α mit einer Erhöhung der RAGE-Expression auf der Monozytenoberfläche zu rechnen ist.

Da nun der regulatorische Einfluss des proinflammatorischen Zytokins TNF- α dargestellt wird, bleibt die Frage offen, inwieweit die Theorie einer Spirale von Aktivierung der RAGE-Rezeptoren auf Monozyten, darauffolgender Erhöhung der proinflammatorischen Mediatoren und folgende Induktion weiterer RAGE-Rezeptoren auf der Monozytenoberfläche zutrifft.

Vor dem Hintergrund einer sowohl erhöhten RAGE-Expression als auch einem gesteigerten Risiko zur Entwicklung vaskulärer Erkrankungen beim Diabetiker, stellen wir die Hypothese auf, dass die RAGE-Aktivierung in humanen Monozyten die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen fördert, welche dann wiederum die zelluläre RAGE-Expression steigern. Solche Mechanismen könnten zu einer Aktivierungsspirale von RAGE-Induktion und Zellaktivierung beitragen und vielleicht einen neuen Weg aufzeigen, die Monozyten-Aktivierung bei der Hochrisikogruppe der Diabetiker zu erklären.

Daraus ergibt sich nun die folgende Fragestellung:

1. Fördert TNF- α zeitabhängig die Expression von RAGE auf humanen Monozyten?
2. Steigert TNF- α konzentrationsabhängig die Expression von RAGE?
3. Induzieren Zytokine aus Überständen von S100-stimulierten Monozyten eine gesteigerte monozytäre RAGE-Expression?

4. Material

4.1 Substanzen und Lösungen

Acrylamid	BioRad
APS 10%	Sigma-Aldrich
BenchMark Pre-Stained Protein Ladder	Invitrogen
Bromphenolblau	Sigma Diagnostics
Buffycoat	Blutspendezentrale
β -Mercaptoethanol	Sigma Diagnostics
Filter Paper	BioRad
Glycerol	J.T. Baker
Glycin	Carl Roth GmbH & Co
HBSS	Sigma-Aldrich
Humanes Serum	PAA Laboratories
Hybond-C	Amersham Biosciences
<u>Laemli (5x)</u>	5 ml 0,5 M Tris pH 6,8 4 ml Glycerol 0,8 g SDS 0,5 ml β -Mercaptoethanol 125 mg Bromphenolblau ad 10 ml Aqua dest.
Lymphozyten Separationsmedium	PAA Laboratories GmbH
<u>Lysispuffer</u>	NP40 0,005% Proteinaseinhibitoren 0,005% 100 mM PMSF
<u>Medium Monozyten</u>	RPMI 1640 10% humanes Serum 1% Penicillin/Streptomycin

Methanol	Merck
Micro BCA™ Protein Assay Kit	Pierce
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co
NaCl	Delta-Pharma
NP 40	Sigma Diagnostics
Nuclon	Nuc A/S
PBS	PAA Laboratories GmbH
Penicillin/Streptomycin	Biochrom
Percoll	Sigma-Aldrich
PMSF	Sigma-Aldrich
Proteinaseinhibitoren	Sigma-Aldrich
Restore Western Blot Stripping Buffer	Pierce
RPMI 1640	PAA Laboratories GmbH
<u>Running Buffer (10x)</u>	30,3 g Tris Base 141 g Glycin 10 g SDS ad 1 l Aqua dest. pH 8,3
<u>Samplegel 12%</u>	72 ml 30% Acrilamid 59,04 ml Aqua dest. 45 ml 1,5 M Tris pH 8,8 1,8 ml 10% SDS
SDS	Carl Roth GmbH & Co
<u>Stackgel 5%</u>	15 ml 30% Acrylamid 61,8 ml Aqua dest. 11,25 ml 1,0 M Tris pH 8,8 0,9 ml 10% SDS

SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce
<u>TBS</u>	20 mM Trizma Base 150 mM NaCl
<u>TBST</u>	TBS 0,01% Tween 20
Temed	Sigma-Aldrich
TNF- α , human	Sigma-Aldrich
<u>Transfer Buffer (10x)</u>	30,3 g Tris Base 112,6 g Glycin ad 1 l Aqua dest. pH 8,8
Trizma Base	USB
Tween 20	Sigma-Aldrich
 4.2 Antikörper	
Anti-goat HRP	Sigma-Aldrich
Anti-mouse HRP	Dako
Anti-RAGE	Santa Cruz Biotechnologie
Anti- α -Tubulin monoclonal	Sigma-Aldrich

4.3 Geräte und Verbrauchsmaterial

Blotgerät	Biorad
Brutschrank	Heraeus
Chromatographiepapier	Whatman International
Elisa Reader	DPC
Laminar Air Flow Bench	Heraeus
Leucosep-Isolationsröhrchen	Greiner Labortechnik
Mikroskop	Leica
Netzgerät	Biometra
Neubauerkammer	Brand
pH-Meter	WTW
Pipetten	Gilson
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße 15 ml und 50 ml	Becton Dickinson
Reaktionsplatten, 96-well	Greiner
Röntgenfilme	Amersham Pharmacia
Röntgenkassetten	Rego
Western Blot Kammer	Biometria
Zellkulturschalen 100 mm	Becton Dickinson
Zellschaber	Becton Dickison
Zentrifugen	Sorvall RC-5B, Kendro Multifuge 3S-R, Kendro

5. Methoden

5.1 Isolation von Monozyten aus Buffy coats

Die humanen Monozyten werden aus frischen buffy coats isoliert, die bis zur Verarbeitung bei 7°C gelagert werden. Die Isolation der Zellen wird unter sterilen Bedingungen durchgeführt um Kontaminationen zu vermeiden. Es werden vier 50 ml Leucosep-Isolationsröhrchen mit Filterscheibe jeweils mit 15 ml Leukozytenseparationsmedium gefüllt und abzentrifugiert. Der buffy coat wird mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 80 ml verdünnt. Je 20 ml des verdünnten Bluts wird auf die bereits vorbereiteten Isolationsröhrchen gegeben und bei 2500 RPM zehn Minuten lang zentrifugiert. Erythrozyten, Thrombozyten und Granulozyten haben sich nun unter dem Filter angesammelt. Entsprechend ihrer Dichte befindet sich über der Filterscheibe eine Schicht mononukleärer Zellen, die von Blutserum überlagert wird. Das Serum wird vorsichtig abgesaugt und die gebildete Monozytenbande mit der Pipette abgenommen. Die Monozyten aus den vier Reaktionsgefäßen werden nun in zwei 50 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen werden in PBS gut resuspendiert und bei 1100 RPM zehn Minuten lang zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wird verworfen und der Waschschrift wiederholt. Das dadurch erhaltene Monozytenpellet wird nun in 3 ml PBS resuspendiert. 30 ml Percoll werden per Titration mit HBSS auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt. In zwei 15 ml Reaktionsgefäße werden jetzt jeweils 7 ml Percoll und 3 ml mononukleäre Zellen gemischt. Die Zellen werden bei 2000 RPM dreißig Minuten lang mit einem Festwinkelrotor ohne Bremse zentrifugiert. Die Monozyten haben sich dann als oberste Zellbande abgesetzt, können in ein 50 ml Gefäß überführt und nochmals mit PBS gewaschen werden. Das somit erhaltene Monozytenpellet wird in 0,5%igem RPMI Medium resuspendiert.

5.2 Zellzählung

Um für den folgenden Western Blot eine optimale Proteinkonzentration zu erlangen sollten pro Zellkulturschale ca. 10 Millionen Monozyten kultiviert werden. Um die Zellzahl pro Milliliter Monozytensuspension zu ermitteln, werden die Zellen in einer Neubauerkammer gezählt. Es werden 10 µl der frisch isolierten Zellen entnommen, mit 0,5%-igem RPMI Medium verdünnt und gut gemischt. Nun werden 10 µl der Verdünnung auf eine Neubauerzählkammer gegeben und die intakten Monozyten unter dem Mikroskop gezählt. Der Monozytensuspension kann jetzt die entsprechende Menge an Zellen entnommen und mit 0,5%-igem RPMI Medium (mit 1% humanem Serum + P/S) kultiviert werden.

5.3 Stimulation der Monozyten

Es wurden 3 Experimente durchgeführt, denen jeweils eine unterschiedliche Monozytenstimulation zu Grunde lag.

5.3.1 Zeitabhängigkeit

Die Monozyten in den Zellkulturschalen werden jeweils mit einer TNF- α Konzentration von 10 ng/ml behandelt. Die Kontrollzellen bleiben unstimuliert, um eine RAGE-Aktivierung durch andere Faktoren als den beigefügten Stimulantien auszuschließen. Die Monozytenkulturen werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet: Nach 2 h, 4 h, 8 h und 16 h. Die Kontrollzellen werden zusammen mit den 4h-Zellen geerntet und repräsentieren somit eine mittlere Inkubationsdauer.

5.3.2 Konzentrationsabhängigkeit

Den Zellkulturschalen wird jeweils eine steigende Konzentration TNF- α zugegeben: 0,5 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml und 15 ng/ml. Die Kontrollzellen bleiben unstimuliert. Die Monozyten werden nach 8 h Inkubationszeit geerntet. Um auszuschließen, dass die erhaltenen Effekte auf eine Endotoxinkontamination

zurückzuführen sind, werden ebenfalls Experimente mit zuvor hitzeinaktiviertem TNF- α (100° C, 30 Minuten) durchgeführt.

5.3.3 Überstand-Experiment

Den Zellkulturschalen wird 10 ng/ml S100 zugegeben. Die Kontrollzellen (Co-SN) bleiben unstimuliert. Nach einer Inkubationszeit von 6 h wird der Überstand (supernatant) aus den Kulturschalen abgenommen und auf frisch isolierte Monozyten gegeben. Erneut werden Kontrollzellen (neg. Co) angelegt, die nicht stimuliert werden. Ihnen wird anstatt des Überstandes 0,5%-iges RPMI Medium zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von weiteren 6 h werden die Zellen geerntet.

5.3.4 Inkubation

Die Zellschalen werden im Brutschrank bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert.

5.4 Ernten der Monozyten und Lyse der Zellen

Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgt die Weiterverarbeitung der Monozytenkulturen auf Eis gekühlt bei 4°C. Ein Teil des Mediums wird in ein 15 ml Reaktionsgefäß gefüllt. Die Zellen werden mit Hilfe eines Zellschabers im verbliebenen Mediumrest gelöst und ebenfalls in das Reaktionsgefäß zugegeben. Mit dieser Methode können sowohl die schwimmenden als auch die bereits sesshaften Monozyten geerntet werden. Die Zellen werden für fünf Minuten bei 1200 RPM abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das entstandene Pellet kann nun in 1 ml PBS resuspendiert und die Zellen dadurch gewaschen werden. Die Zellsuspension wird in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und fünf Minuten bei 3600 RPM abzentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgesaugt und das entstandene Pellet mit 200 μ l Lysepuffer resuspendiert.

Nach einer Inkubationszeit von zehn Minuten werden die nun lysierten Zellen von

Membranfragmenten durch eine Zentrifugation von fünf Minuten bei 14000 RPM getrennt. Der erhaltene Überstand kann bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C tiefgefroren werden.

5.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung wird nach der kalorimetrischen BCA-Methode mit dem Micro BCA™ Protein Assay der Firma Pierce durchgeführt. 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 Eichgeraden wurden Proteinstandards (Albumin) in absteigender Konzentration von 60 $\mu\text{g/ml}$ bis 0 $\mu\text{g/ml}$ in eine 96-well-Platte pipettiert. Die zu bestimmende Proteinlösung wurde im Verhältnis 1:100 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 eine Stunde bei 60°C inkubiert und anschließend die Extinktion bei 562 nm gemessen.

5.6 Western Blot

Der Western Blot beschreibt eine Methode, mit der sich spezifische Proteine mit Hilfe eines Antikörpers nachweisen lassen.

5.6.1 Herstellung eines nicht-denaturierenden Polyacrylamidgels

Zu Beginn werden zwei Gelglasplatten mit Alkohol gereinigt. Dann werden die Glasplatten fixiert und der entstandene Zwischenraum zu ca. 4/5 mit 12%-igem Samplegel befüllt. Zur Herstellung des Samplegels werden 6 ml 30%-iges

Acrylamid, 5 ml H_2O , 3,8 ml 1,5 M Tris (pH 8,8) und 150 μ l 10% SDS vermischt. Durch Zugabe von 150 μ l APS und 30 μ l Temed beginnt das Gel zu polymerisieren und muss zügig zwischen die Platten gegossen werden.

Um eine gleichmäßige Oberfläche zu schaffen wird das Gel sofort mit Aqua dest. überschichtet. Nach ca. zehn Minuten ist das Gel vollständig polymerisiert und das Aqua dest. kann abgegossen werden. Nun wird das 5%-ige Stackgel hergestellt:

830 μ l 30%-iges Acrylamid, 3,4 ml H_2O , 630 μ l 1,0 M Tris (pH 6,8), 50 μ l SDS. Zur Polymerisation werden 50 μ l APS und 10 μ l Temed beigefügt. Nun wird das Stackgel auf das Samplegel geschichtet und der Kamm eingesetzt. Nach weiteren zehn Minuten kann der Kamm entfernt und die Taschen mit Runningbuffer gespült werden. Gemäß den Anweisungen des Herstellers wird das gegossene Gel in die Western Blot Kammer eingesetzt und die Kammer mit Runningbuffer befüllt.

In der Zwischenzeit werden die zu untersuchenden Proben vorbereitet: Um eine ausreichende Proteinkonzentration zu erhalten, sollte ca. 100 μ g Protein in jede Tasche gefüllt werden. Deshalb wird von jeder Probe eine ihrer Proteinkonzentration entsprechende Menge entnommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1/5 Laemli (5x) versetzt. Die Proben werden nun bei 100 °C für 5 Minuten denaturiert und anschließend in die Geltaschen gefüllt. Es wird außerdem 12 μ l BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder in eine Tasche gefüllt, um die Größe der aufgetrennten Proteine bestimmen zu können.

5.6.2 Elektrophorese

Die Laufzeit des Gels beträgt bei 100 Volt ca. 2 Stunden. Anschließend wird der Runningbuffer verworfen und das Gel vorsichtig von den Glasplatten gelöst.

5.7 Blotten

Die aufgetrennten Proteine werden mittels Semidry-Verfahren auf eine Membran übertragen. Das Gel wird in eine Lösung aus 20 ml Methanol, 20 ml (10x) Transferbuffer und 160 ml Aqua dest. eingelegt. Ebenso die auf Gelgröße

zurechtgeschnittene Nylonmembran und 2 Stück Whatman Papier. Auf das Blotgerät werden nun in folgender Reihenfolge aufeinandergelegt: Whatman Papier, Nylonmembran, Gel, zweites Whatman Papier. Anschließend werden bei 16 Volt (45 Minuten) die Proteine auf die Nylonmembran geblottet.

Nach Abschluss des Blottens werden das Gel und das Whatman Papier verworfen und die Nylonmembran in 5%-iger Milch eine Stunde lang blockiert.

5.8 Markierung des RAGE-Rezeptors mittels spezifischer Antikörper

Nach dem Blockieren wird die Membran 3 x 10 Minuten in TBST gewaschen und über Nacht bei 4°C mit dem Primär- Antikörper inkubiert. Dieser Anti-RAGE-Antikörper wird 1:100 in 5%-iger Milch verdünnt eingesetzt. Anschließend wird der Primär-Antikörper verworfen und die Membran nochmals mit TBST gewaschen, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Der Sekundär-Antikörper Anti-goat (HRP) wird 1:5000 in 5%-iger Milch verdünnt und eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben. Danach erfolgt ein erneuter Waschgang mit TBST.

5.9 Chemolumineszenz

Die Membran wird für 2 Minuten in die Chemolumineszenzlösung eingetaucht, welche die horseradish peroxidase (HRP) auf der Western-Membran detektiert. Anschließend kann die Membran gegen einen Röntgenfilm exponiert werden.

5.10 Stripping

Die Membran kann mit Hilfe einer Strippinglösung von den gebundenen Antikörpern befreit werden. Nach mehreren Waschschrinen in TBST und Blockierung mit 5%-iger Milch, ist die Membran wieder für eine erneute Inkubation mit Antikörpern bereit.

5.11 Nachweis von α -Tubulin

Um eine gleichmäßige Proteinbeladung sicherzustellen, wird α -Tubulin mittels geeigneter Antikörper nachgewiesen. Der Primär-Antikörper Anti- α -Tubulin wird in 5%-iger Milch 1:2000 verdünnt auf die Membran gegeben und eine Stunde inkubiert. Nachdem die Membran mit TBST gewaschen wurde, kommt es zum Einsatz des Sekundär-Antikörpers Anti-mouse (HRP) in einer Verdünnung von 1:5000. Die Membran wird erneut gewaschen und nach Behandlung mit einer Chemolumineszenzlösung gegen einen Röntgenfilm exponiert.

5.12 Densitometrie

Densitometer sind Dichtemessgeräte und werden zur Messung der Filmschwärzung des Röntgenfilms verwendet, somit wird eine quantitative Auswertung der RAGE-Banden ermöglicht.

Die hier verwendete Densitometrie beruht auf dem Verfahren der Durchlichtmessung. Das durch eine Optik gebündelte Licht durchleuchtet die zu messende Stelle auf dem Film. Je nach Stärke der Schwärzung bzw. der Graustufung im Messpunkt wird ein Teil des einfallenden Lichtes absorbiert. Der verbleibende Teil des Lichtes wird vom Fotoempfänger des Densitometers registriert und auf elektronischem Wege mit der Stärke des auftreffenden Lichtes ins Verhältnis gesetzt. Der Dichtewert berechnet sich aus dem Logarithmus der

Opazität, welche sich aus dem Kehrwert der Transparenz ($T = \text{durchgelassene Lichtintensität} / \text{auftreffende Lichtintensität}$) ergibt.

5.13 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.

6. Ergebnisse

6.1 TNF- α fördert zeitabhängig die Expression von RAGE-Rezeptoren

Hierzu wurden humane Monozyten mit TNF- α (10ng/ml) stimuliert und zu unterschiedlichen Inkubationszeiten geerntet: nach 2h, 4h, 8h und 16h. Die induzierte RAGE-Protein Expression wurde anhand Western Blot Analyse und anschließender Densitometrie ermittelt.

Gegenüber der unstimulierten Kontrollgruppe nahm die RAGE-Protein Expression mit steigender TNF- α Inkubationszeit kontinuierlich zu bis sie ihren Höhepunkt bei 8 Stunden erreichte. Die induzierte RAGE-Expression stieg von $1,00 \pm 0,00$ bei den Kontrollzellen auf $3,37 \pm 2,18$ ng/ml bei den 8h-stimulierten Monozyten.

Bei einer Inkubationszeit von mehr als 8 Stunden kam es zu einem Rückgang der RAGE-Expression auf $2,44 \pm 1,51$ bei den 16h-stimulierten Zellen. Wobei es nach 16 Stunden immer noch eine deutliche RAGE-Induktion verglichen mit den Kontrollzellen gab. (Abbildung 1 und 2)

Western Blot Analyse

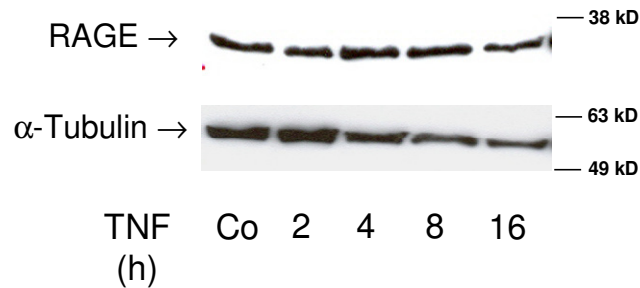


Abbildung 1: Western Blot Analyse: TNF- α erhöht die RAGE-Proteinkonzentration in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot, auf dem die vermehrte RAGE-Induktion nach einer Inkubationszeit von acht Stunden deutlich zu sehen ist, wenn die unterschiedlichen Mengen an geladenem Protein berücksichtigt werden. Um die Ladeverhältnisse zu zeigen, wurde dieselbe Membran mit Anti- α -Tubulin behandelt. (RAGE: Receptor for advanced glycation end products; TNF: Tumornekrosefaktor- α ; Co: Kontrollzellen; h: hour, Angabe der Inkubationszeit in Stunden; kD: Kilodalton)

Zeitabhängigkeit von TNF

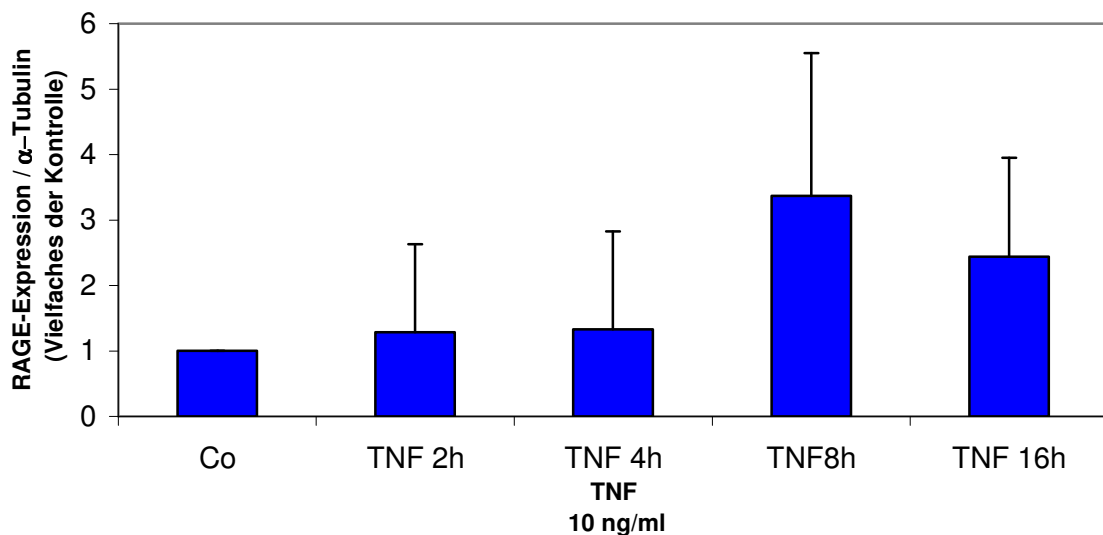


Abbildung 2: Zeitabhängige Effekte von TNF- α auf die Expression von RAGE-Rezeptoren.

Die Säulen stellen den Mittelwert \pm Standardabweichung dar; Vergleich der 8h-stimulierten Monozyten mit den Kontrollzellen, berechnet aus fünf Experimenten.

(Abkürzungen: Co: Kontrollzellen; TNF: Tumornekrosefaktor- α ; h: hour, Angabe der Inkubationszeit in Stunden)

6.2 TNF- α steigert konzentrationsabhängig die Expression von RAGE-Rezeptoren

Um zu untersuchen, welche Konzentration des proinflammatorischen Zytokins TNF- α zu einer Induktion der RAGE-Expression führt, wurden humane Monozyten mit steigenden Konzentrationen von TNF- α behandelt: 0,5 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 15 ng/ml. Die Monozyten wurden alle nach 8 Stunden Inkubationszeit geerntet. Wiederum wurde die induzierte RAGE-Protein-Expression mittels Western Blot Analyse und Densitometrie dargestellt.

Es zeigte sich, dass die RAGE-Protein Expression mit steigender TNF- α Konzentration stetig zunahm, bei 10 ng/ml TNF- α ihren maximalen Höhepunkt erreichte und danach wieder zurückging.

Es kam zu einer $2,14 \pm 0,59$ fachen RAGE-Induktion bei einer TNF- α Konzentration von 10 ng gegenüber den Kontrollzellen ($p < 0,05$; $n=5$).

Um sicherzustellen, dass die beobachteten Effekte auf die RAGE-Expression nicht durch Endotoxin bedingt sind, wurden Monozyten mit 10 ng/ml hitzeinaktiviertem TNF- α über 8 Stunden inkubiert. Hierunter zeigte sich keine Induktion der RAGE-Expression.

(Abbildung 3 und 4)

Western Blot Analyse

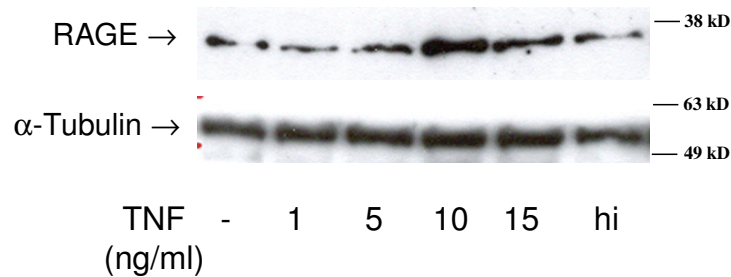


Abbildung 3: Repräsentative Western Blot Analyse zur Darstellung der konzentrationsabhängigen Expression von RAGE-Protein.

Es ist ein deutlicher Anstieg der RAGE-Proteinkonzentration bis zum Höhepunkt bei 10 ng/ml TNF- α zu sehen. Um gleichmäßige Ladungsverhältnisse zu gewährleisten wurde die Membran mit Anti- α -Tubulin behandelt.

(TNF: Tumornekrosefaktor- α ; hi: hitzeinaktiviert, als Negativkontrolle)

Konzentrationsabhängigkeit von TNF

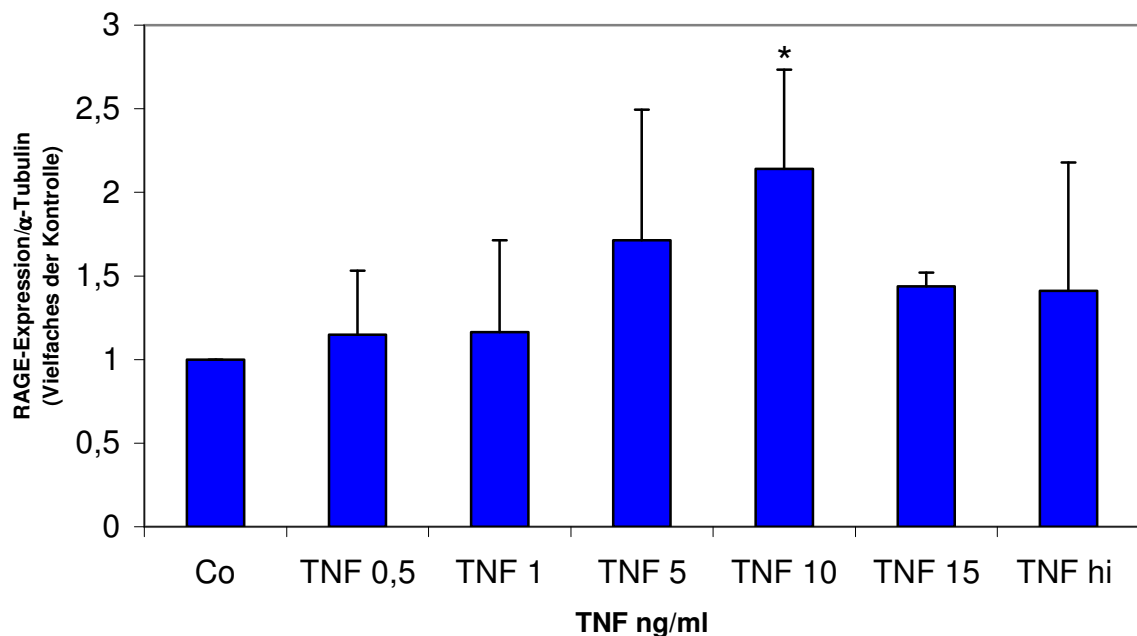


Abbildung 4: Konzentrationsabhängige Effekte von TNF- α auf die RAGE-Expression.

Die Säulen stellen den Mittelwert \pm Standardabweichung dar; Signifikante * ($p < 0,05$) Erhöhung der RAGE-Expression verglichen mit Kontrollzellen, berechnet aus fünf Experimenten.

(Abkürzungen: Co: Kontrollzellen; TNF: Tumornekrosefaktor- α ; hi: hitzeinaktiviert, als Negativkontrolle)

6.3 Zytokine aus den Überständen von S100 stimulierten Monozyten induzieren eine gesteigerte RAGE-Expression

Um darzustellen, dass eine Aktivierung von RAGE-Rezeptoren zur vermehrten Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren führt und dies wiederum eine vermehrte Expression von RAGE-Rezeptoren induziert, wurden Monozyten mit 10 ng/ml S100 über 6 Stunden stimuliert. S100, ein RAGE-Rezeptor-Agonist, setzt durch seine Interaktion mit dem Rezeptor über eine Aktivierung des NFκB-Signalweges Zytokine wie TNF-α oder IL-6 frei. Der Überstand der Zellkulturen, der nun diese Zytokine beinhaltet, wird auf unstimulierte Monozyten gegeben und diese Zellen wiederum für 6 Stunden inkubiert. Danach konnte mittels Western Blot und Dichtemessung die erwartete Steigerung der RAGE-Rezeptor-Expression gezeigt werden. Durch Zugabe von Überständen, die von S100 stimulierten Zellen stammen, fand eine $7,17 \pm 7,39$ fache RAGE-Induktion gegenüber den Kontrollzellen ($2,98 \pm 1,81$) statt, die mit Überständen von unstimulierten Monozyten behandelt wurden.

Monozyten (neg. Co), die anstatt der zytokinhaltigen Überstände nur mit Medium inkubiert wurden, wiesen eine deutlich geringere RAGE-Expression auf als die Kontrollzellen.

(Abbildung 5 und 6)

Western Blot Analyse

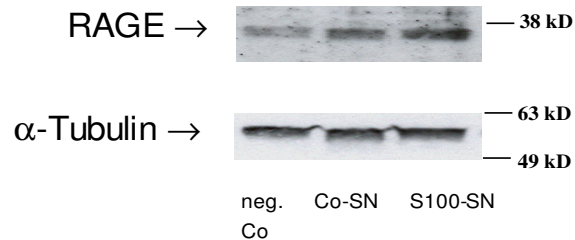


Abbildung 5: Repräsentative Western Blot Analyse zur Darstellung der erhöhten RAGE-Protein Expression bei Monozyten, die mit Überständen von S100-behandelten Zellen inkubiert wurden.

Die vermehrte RAGE-Proteinkonzentration bei Zellen, die mit Überständen von S100-behandelten Zellen inkubiert wurden, ist klar zuerkennen im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen.

(neg Co: Negativkontrolle, Monozyten, inkubiert mit Medium; Co-SN: Monozyten, inkubiert mit Überständen von unstimulierten Zellen; S100-SN: Monozyten, inkubiert mit Überständen von Zellen, die mit S100 stimuliert wurden)

Überstand Experiment

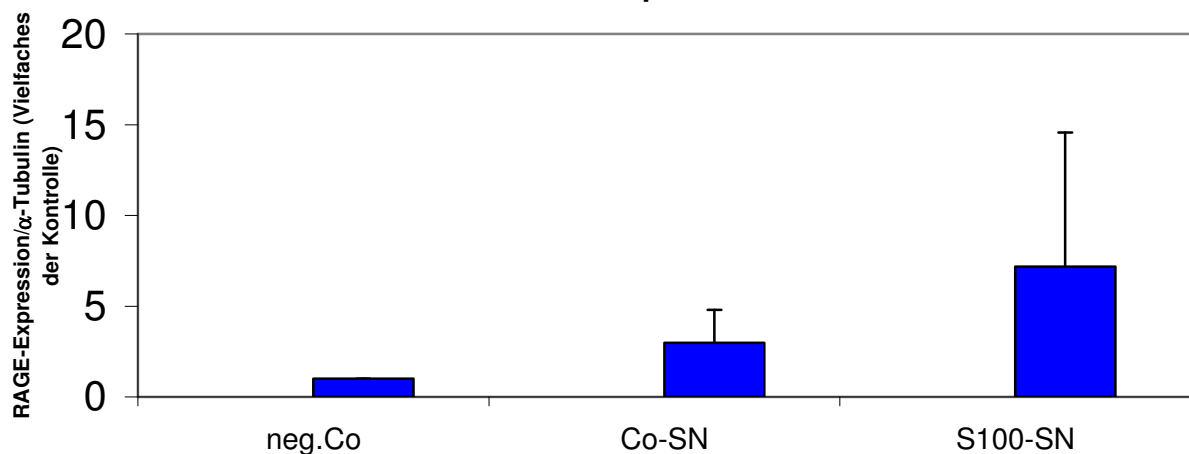


Abbildung 6: Überstände von S100 stimulierten Monozyten induzieren RAGE-Protein-Expression.

Die Säulen stellen den Mittelwert \pm Standardabweichung dar; berechnet aus fünf Experimenten.

(neg.Co: Negativkontrolle, Co-SN: Kontrollzellen, inkubiert mit Überständen von unstimulierten Zellen; S100-SN: Monozyten, inkubiert mit Überständen von S100 stimulierten Zellen)

7. Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Regulation der RAGE-Expression von humanen Monozyten unter dem Einfluss des proinflammatorischen Zytokins TNF- α . Es konnte gezeigt werden, dass TNF- α die RAGE-Expression konzentrationsabhängig und zeitabhängig induziert.

Ferner konnte durch eine Stimulation der RAGE-Rezeptoren durch S100 und Transfer des Überstandes auf frisch isolierte Monozyten eine gesteigerte RAGE-Expression ausgelöst werden.

In Zusammenhang mit anderen Daten unserer Arbeitsgruppe zeigte sich, dass die S100-bedingte RAGE-Aktivierung in humanen Monozyten die Expression proinflammatorischer Zytokine induziert, und dass diese Zytokine wiederum die Expression von RAGEs in diesen Zellen steigern und dadurch die Empfindlichkeit der Zelle gegenüber proinflammatorischen RAGE-Aktivator-Effekten erhöht wird.

7.1 Zytokine

Bei Zytokinen handelt es sich um im Blut zirkulierende Proteine, die das Verhalten oder die Eigenschaften anderer Zellen ändern. Hauptsächlich sind Immunzellen wie Monozyten, Makrophagen und T-Zellen für die Sekretion von Zytokinen verantwortlich. Sie können aber auch von Fibroblasten und Endothelzellen gebildet werden. Zur Gruppe der Zytokine gehören die proinflammatorischen Mediatoren TNF- α , Interleukin-1 und Interleukin-6, aber auch verschiedene Wachstumsfaktoren.

TNF- α (syn. Kachektin) ist ein von Makrophagen/Monozyten, Lymphozyten und Mastzellen gebildetes Zytokin mit Einfluss auf Entzündung, Sepsis, Lipid- und Proteinstoffwechsel, Blutbildung, Angiogenese, Wundheilung und Immunabwehr sowie zytolytischer bzw. zytostatischer Wirkung auf Tumorzellen.

Im Zuge der Atherogenese sind Monozyten in die Entstehung arteriosklerotischer Läsionen involviert, indem sie proinflammatorische Zytokine wie TNF- α und Il-6 sezernieren. Diese Zytokine stimulieren andere Zellen der Gefäßwand und tragen somit zum vaskulären Entzündungsprozess bei.

Interessanterweise bilden Patienten mit unter anderem dem subklinischen Diabetes einen höheren Serumspiegel von TNF- α und Il-6 aus, was den Entzündungsprozess in ihrer Gefäßwand reflektiert.

Zum Beispiel wird Tissue Factor (TF) normalerweise nicht von zirkulierenden Monozyten hergestellt, kann aber als Antwort auf inflammatorische Moleküle exprimiert werden. Die abnorme TF-Expression von Monozyten ist unter anderem verantwortlich für die bei Sepsis, entzündlichen Erkrankungen und akuten Koronarsyndromen vorkommende Thrombose [57]. TF ist ein transmembranes Glykoprotein und der Rezeptor für die Plasmafaktoren VII und VIIa. Der TF-VIIa Komplex wird als Hauptinitiator der Gerinnungskaskade angesehen. Die exzessive Aktivierung der Gerinnungskaskade wurde bei Diabetikern beobachtet und kann eine wichtige Rolle bei der Entstehung von vaskulären Komplikationen spielen [32].

Hiermit wird deutlich in welchem Ausmaß proinflammatorische Zytokine wie TNF- α und Il-6 in die Körperfunktionen eingreifen können und vor allem durch ihre erhöhte Ausschüttung bei Diabetikern beitragen können zur Ausbildung arteriosklerotischer Läsionen und deren Folgeerkrankungen.

7.2 RAGE-Expression

RAGE ist ein integrales Membranprotein, das als Zelloberflächenrezeptor für AGEs fungiert und unter anderem auch auf Endothelzellen und auf Monozyten zu finden ist.

Da Endothelzellen (ECs) die vaskuläre Oberfläche des Gefäßes bilden, sind sie den im Blut zirkulierenden AGEs direkt ausgesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass die Exposition von kultivierten ECs gegenüber AGE-Albumin die Expression des antikoagulatorischen Cofaktors Thrombomodulin unterdrückt, die Diffusion makromolekularer Teilchen durch die EC-Schicht erhöht und zu einer andauernden Induktion des prokoagulatorischen Cofaktors Tissue Factor führt.

Zusätzlich erhöhen AGEs die prokoagulatorische Antwort der ECs auf TNF- α [17, 61].

AGE-Rezeptoren, die auf dem Endothel exprimiert werden, sorgen für die Rezeptor-vermittelte Aufnahme des Liganden aus dem intravaskulären Raum mit der Möglichkeit die glykierten Proteine in das Subendothel zu schleusen. Dort können AGEs Kreuzverbindungen mit langlebigen Komponenten der extrazellulären Matrix bilden. Wird AGE-Albumin Mäusen infundiert, zeigt sich in der Anfangsphase ein schneller Anstieg der Plasmaclearance, der mit nativem Albumin nicht beobachtet werden kann und die AGEs akkumulieren in der Leber, Lunge, Niere, Darm und Herz [60, 61].

Sowohl die schnelle Phase der AGE- Albumin Clearance als auch ihre Ablagerung in den Geweben wird durch Anti-RAGE-IgG vollständig blockiert. Die Wahrscheinlichkeit, dass diese frühen Interaktionen von zirkulierenden AGEs und RAGE weiterreichende Konsequenzen haben, wird dadurch verdeutlicht, dass innerhalb einer Stunde nach der AGE-Albumin Infusion der Spiegel von Zytokin-(Interleukin-6)-mRNA steigt und eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B stattfindet, wobei beide durch Anti-RAGE-IgG blockiert werden können [73, 60, 61].

Endothelzellen zeigen eine basale RAGE-Expression, die durch Stimulation der Zellen mit proatherogenen Substanzen wie AGEs, TNF- α oder dem Hormon β -Östradiol verstärkt werden kann [11, 67, 34]. Die Bindung dieser Liganden an RAGE führt zur Bildung von intrazellulärem oxidativen Stress. Die gesteigerte RAGE-Expression durch AGEs, TNF- α oder β -Östradiol wird durch den Transkriptionsfaktor NF κ B (bei AGEs und TNF- α) bzw. SP-1 (bei β -Östradiol) vermittelt [67, 34]. Durch Phosphorylierung und Degradation des zytoplasmatischen Inhibitors I κ B werden Proteine der NF κ B-Familie freigesetzt, können in den Zellkern translozieren und die NF κ B-abhängige Genexpression induzieren [3]. So stimuliert die RAGE-Aktivierung die Expression von proatherogenen Molekülen wie VCAM-1, MCP-1 oder Zytokinen und fördert dadurch die Entstehung von arteriosklerotischen Läsionen bei Diabetikern.

Interessant ist auch, dass Patienten mit Diabetes mellitus dauerhaft aktiviertes NF κ B aufweisen, als Folge der dauernden RAGE-Stimulation [46].

Von Monozyten als professionelle Scavenger würde man hingegen erwarten, dass sie mit AGEs interagieren, indem sie diese abbauen. Jedoch wurden auf den Zellen RAGE als spezifischer Oberflächenrezeptor für AGEs gefunden. Durch die AGE-vermittelte Chemotaxis gewinnen Monozyten Zugang zu einer AGE-reichen Umgebung [59]. Lösliche AGEs induzieren die Monozytenmigration, indem die Zellen einem Konzentrationsgefälle folgen. Wenn die Monozyten auf immobilisierte AGEs im Gewebe oder in der Gefäßwand stoßen, beenden sie ihre Migration und binden an die AGE-modifizierte Oberfläche. Sowohl bei Endothelzellen als auch bei Monozyten konnte gezeigt werden, dass zum einen eine spezifische, sättigbare Oberflächenbindung zwischen AGE/RAGE erfolgt und zum anderen auch eine zelluläre Aufnahme durch Endozytose möglich ist [17, 59]. Die Interaktion von Monozyten und AGEs führt zur Ausbildung eines aktivierten Phänotyps, welcher Wachstumsfaktoren wie platelet-derived growth factor, insulin-like growth factor-1 und proinflammatorische Zytokine wie Il-1 und TNF- α sezerniert [29, 28, 68]. Auch in humanen Monozyten hängt die Induktion der Zytokin-Expression von der Aktivierung der Transkriptionsfaktors NF κ B ab. Es konnte gezeigt werden, dass die AGE bzw. S100 vermittelte TNF- α Expression ebenfalls eine NF κ B-Aktivierung in humanen Monozyten beinhaltet. Diese Beobachtung stimmt mit Studien überein, welche eine verlängerte NF κ B-Aktivierung mit RAGE-Aktivatoren in Endothelzellen oder glatten Gefäßmuskelzellen fanden. So scheint NF κ B ein gängiger Signalweg nach einer RAGE-Aktivierung in verschiedenen Zelltypen zu sein. Während jedoch Zytokine NF κ B nur kurzfristig aktivieren können, handelt es sich bei der RAGE-vermittelten Zellaktivierung um einen andauernden Zustand.

Tatsächlich zeigt die vorliegende Arbeit, dass das proinflammatorische Zytokin TNF- α zu einer Erhöhung der Expression von RAGE-Rezeptoren auf der Oberfläche von humanen Monozyten führt. Diese Hochregulierung der Rezeptorexpression kann mit steigender TNF- α Konzentration bis zum Sättigungspunkt weitergeführt werden.

Danach ist mit steigender TNF- α Konzentration keine weitere Vermehrung der Rezeptoren auf der Monozytenoberfläche zu erreichen.

Ebenso kann demonstriert werden, dass die RAGE-Expression zeitabhängig durch den Einfluss von TNF- α gesteigert werden kann. Sind Monozyten einer TNF- α Konzentration von 10 ng/ml ausgesetzt, kann eine kontinuierliche RAGE-Expressionssteigerung über 8 Stunden festgestellt werden. Weitere Einwirkung von TNF- α führt zu keiner fortführenden Expressionssteigerung. Es kann davon ausgegangen werden, dass die durch TNF- α initiierte Steigerung der RAGE-Expression durch eine gesteigerte Transkription von RAGE-mRNA erfolgt. Dies bedeutet keine posttranskriptionelle Steigerung durch einen verzögerten Abbau der mRNA, wie von anderen Proteinen bekannt ist.

Werden humane Monozyten mit S100 über 6 Stunden stimuliert und deren Überstände auf frisch isolierte Monozyten übertragen, so kann nach weiteren 6 Stunden eine Steigerung der RAGE-Rezeptor-Expression beobachtet werden. Die Experimente wurden an frisch isolierten Monozyten durchgeführt um jegliche Effekte durch ein Absterben der Zellen zu verhindern. Die beobachteten Effekte entstehen tatsächlich über eine RAGE-Aktivierung, da S100 ein RAGE-Aktivator ohne bekannte Funktion in anderen Signalwegen ist. Die proinflammatorischen Zytokine, die aufgrund der S100-Stimulation von Monozyten freigesetzt werden, sind dazu fähig, die RAGE-Expression in diesen Zellen zu steigern. Die Effekte von TNF- α und anderen Zytokinen auf die RAGE-Expression haben eine wichtige funktionelle Relevanz: Ein Anstieg der monozytären RAGE-Expression, wie hier gezeigt, erhöht die Empfindlichkeit der Zelle gegenüber proinflammatorischen S100-Effekten, was die Hypothese bestätigt, dass durch die Menge der RAGE-Expression die Reaktion der Zelle auf RAGE-Aktivatoren festgelegt wird. Zusätzlich sind Überstände von S100-behandelten Zellen, welche große Mengen an TNF- α und Il-6 beinhalten, dazu fähig monozytäre RAGE-Expression in

parakriner Weise zu induzieren und so zu einem Teufelskreis der Zellaktivierung beizutragen.

Auch AGEs, die bei Patienten mit Diabetes mellitus bekanntlich erhöht sind, können in einem ersten Schritt die monozytäre Expression von proinflammatorischen Zytokinen induzieren, welche dann wiederum die Empfindlichkeit der Zelle gegenüber AGE-Effekten erhöhen, indem die monozytäre RAGE-Expression hochreguliert wird. Dieser Mechanismus führt zu einer lang anhaltenden Aktivierung von humanen Monozyten, welche die Entwicklung von arteriosklerotischen Läsionen bei Diabetikern unterhält.

7.3 Circulus vitiosus der Zellaktivierung

Durch die Tatsache, dass Diabetiker sowohl eine gesteigerte monozytäre RAGE-Expression als auch ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung vaskulärer Erkrankungen haben, stellten wir die Hypothese auf, dass die Aktivierung von RAGEs in humanen Monozyten die Sekretion proinflammatorischer Zytokine stimuliert, was wiederum die zelluläre RAGE-Expression steigert. Ein solcher Mechanismus könnte zu einem Teufelskreis von RAGE-Induktion und Zell-Aktivierung beitragen und vielleicht einen neuen Weg darstellen die Monozyten-Aktivierung in der Hochrisikopopulation der Diabetiker zu erklären.

In anderen Studien konnte bislang durch in vitro Experimente gezeigt werden, dass die Transfektion von RAGE-antisense Oligonukleotiden oder die Inhibition der AGE-Bindung durch anti-RAGE-Antikörper die AGE-Effekte in vaskulären Zellen eingrenzt [7]. Dies macht ebenfalls deutlich, dass das Ausmaß der RAGE-Expression auf der Zelloberfläche die Empfindlichkeit der Zelle gegenüber proinflammatorischen RAGE-Aktivator-Effekten festlegt.

7.4 Bedeutung für die Arteriosklerose beim Diabetiker

Lange Zeit galt die Arteriosklerose als eine nicht beeinflussbare degenerative Erkrankung der Gefäßwand. Erst durch die Arbeiten der letzten Jahre hat sich das Verständnis für die Entstehung der Arteriosklerose gewandelt. Heute ist bekannt, dass es sich bei der Atherogenese um einen inflammatorischen Prozess in der Gefäßwand handelt, der über Jahre in verschiedenen Phasen verläuft und inflammatorische Zellen sowie Zytokine, Wachstumsfaktoren und Chemokine involviert [56, 36, 38].

Die vorliegende Arbeit trägt zum Verständnis bei, dass Zytokine eine wichtige Aufgabe innerhalb der Atherogenese und der Entstehung von vaskulären Komplikationen bei Diabetikern übernehmen.

Bislang wird glykiertes Hämoglobin (HbA_{1c}) zur Überprüfung einer antidiabetischen Therapie verwendet. Es zeigt indirekt Glykierung und AGE-Bildung an: bei schlechter Glukosekontrolle kommt es zur Zunahme der AGEs und der AGE-vermittelten Zellaktivierung.

Darüber hinaus sind erhöhte Zytokin-Serumspiegel prädiktiv für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse [36, 38, 55]. Proinflammatorische Zytokine wie $\text{TNF-}\alpha$ lassen sich direkt im Blut nachweisen. Einige der Zytokine, wie $\text{TNF-}\alpha$ oder Interleukin-6, führen zur Induktion von Akut-Phase-Proteinen wie C-reaktivem Protein (CRP) und Serum Amyloid A (SAA) [42]. Diese werden wiederum ins Blut sezerniert und könnten in Zukunft als inflammatorische Biomarker in die Risikostratifizierung von Patienten einbezogen werden [55]. Bislang konnte in Studien gezeigt werden, dass gesunde Individuen mit CRP-Spiegeln, die an der oberen Grenze der Norm liegen, im Vergleich zu solchen mit Werten an der unteren Grenze der Norm ein signifikant erhöhtes Risiko für das Auftreten eines Myokardinfarktes oder eines kardiovaskulären Todes haben [42, 36, 38, 31]. Es zeigte sich außerdem, dass eine Senkung der erhöhten Serumspiegel dieser Marker, z.B. durch Statine, die Mortalität signifikant reduziert [54].

Es wären aber noch andere Möglichkeiten zur Verminderung des proinflammatorischen Effektes der Zytokine denkbar.

Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB gilt als eine der Schlüsselreaktionen distal von AGE-Bildung und der Entstehung von oxidativem Stress und ist der Geninduktion von Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen unmittelbar vorangeschaltet. Daher werden Ansätze verfolgt NFκB-Aktivierung und Wirkung zu supprimieren [46].

Die Entstehung von Arteriosklerose bei Patienten mit Diabetes mellitus ist multifaktoriell bedingt. In der vorliegenden Arbeit konnte die Bedeutung der Zytokine und der Monozyten als wichtige Teilaspekte in der Atherogenese aufgezeigt werden. Sie tragen maßgeblich dazu bei einen Circulus vitiosus aus RAGE-Aktivierung, Hochregulation der Rezeptorexpression und darauffolgende Steigerung der Zellsensibilität für RAGE-Aktivatoren auszubilden, der das Fortschreiten der arteriosklerotischen Läsionen bei Diabetikern unterhält.

8. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit trägt zu der Erkenntnis bei, dass die Effekte von TNF- α auf die RAGE-Expression eine wichtige funktionelle Relevanz in der Entstehung von arteriosklerotischen Läsionen bei Diabetikern haben könnte.

Hiermit konnte der Einfluss des proinflammatorischen Zytokins TNF- α auf die Regulation der Expression von RAGE-Rezeptoren auf humanen Monozyten demonstriert werden.

Mit zunehmender Konzentration des verwendeten Zytokins TNF- α , wurde eine Expressionsinduktion der RAGEs auf der Oberfläche von Monozyten ausgelöst.

Es zeigte sich, dass diese gesteigerte Expression abhängig von der Länge der Inkubationszeit des Zytokins TNF- α ist.

Darüber hinaus wurde die Tatsache erhärtet, dass es zur Ausbildung eines Teufelskreises durch die Zytokin-bedingte Hochregulierung von RAGEs und die darauffolgende Sensibilitätserhöhung der Zelle gegenüber RAGE-Aktivatoren kommt.

Dies wird durch die Überstand-Experimente deutlich, in denen durch Inkubation der Monozyten mit S100-haltigem Medium und Übertragung des Überstandes auf frisch isolierte Zellen eine RAGE-Expressionssteigerung bei diesen Zellen ausgelöst werden konnte. Somit kann bestätigt werden, dass durch die Menge der RAGE-Expression die Reaktion der Zelle auf RAGE-Aktivatoren festgelegt wird.

TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
RAGE	Receptor for advanced glycation end products
S100	RAGE-Rezeptor-Agonist

9. 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 (1991) 1223-1230
2. Baeuerle P: The inducible transcription activator NF κ B: Regulation by distinct protein subunits. *Biochim Biophys Acta* 1072 (1991) 63-80
3. Baeuerle P, Baltimore D: NF κ B: ten years after. *Cell* 87 (1996) 13-20
4. Balletshofer BM, Ritting K, Enderle MD, Volk A, Maerker E, Jacob S, Matthaei S, Rett K, Haring HU: Endothelial dysfunction is detectable in young normotensive first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes in association with insulin resistance. *Circulation* 101 (2000) 1780-1784
5. Bann HF, Higgins PJ: Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance. *Science* 213 (1981) 222-224
6. Beckman JA, Creager MA, Libby P: Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA* 287 (2002) 2570-2581
7. Bierhaus A, Chevion S, Chevion M, Quehenberger P, Hofmann M, Illmer T, Luther T, Berentshein E, Tritschler H, Müller M, Wahl P, Ziegler R, Nawroth PP: Advanced glycation endproducts (AGEs) induced activation of NF κ B is suppressed by α -lipoic acid in cultured endothelial cells. *Diabetes* 46 (1997) 1481-1490
8. Bierhaus A, Illmer T, Kasper M, Luther T, Quehenberger P, Tritschler H, Wahl P, Ziegler R, Muller M, Nawroth PP: Advanced glycation end product (AGE)-mediated induction of tissue factor in cultured endothelial cells is dependent on RAGE. *Circulation* 96 (1997) 2262-2271
9. Bierhaus A, Hofman 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 (1998) 586-600
10. Bierman EL: George Lyman Duff Memorial Lecture. Atherogenesis in diabetes. *Arterioscler Thromb* 12 (1992) 647-656

11. Brett J, Schmidt AM, Yan SD, Zou YS, Weidman E, Pinsky D, Nowygrod R, Neeper M, Przysiecky 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 (1993) 1699-1712
12. Bucala R, Model P, Cerami A: Modifications of DNA by reducing sugars: a possible mechanism for nucleic acid aging and age-related dysfunction in gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 81 (1984) 105-109
13. Bucala R, Tracey KJ, Cerami A: Advanced glycation end products quench nitrite oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilation in experimental diabetes. *J Clin Invest* 87 (1991) 432-438
14. Bucala R, Makita Z, Koschinsky T, Cerami A, Vlassara H: Lipid advanced glycosylation: pathway for lipid oxidation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (1993) 6434-6438
15. Bucala R, Makita Z, Vega G, Grundy S, Koschinsky T, Cerami A, Vlassara H: Modification of LDL by advanced glycosylation endproducts contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 (1994) 9441-9445
16. Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr.: Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 251 (1991) 788-791
17. Esposito C, Gerlach H, Brett J, Stern D, Vlassara H: Endothelial receptor-mediated binding of glucose-modified albumin is associated with increased monolayer permeability and modulation of cell surface coagulant properties. *J Exp Med* 170 (1989) 1387-1407
18. Esposito C, Fasoli G, Plati AR, Bellotti N, Conte MM, Cornacchia F, Foschi A, Mazzullo T, Semeraro L, Dal-Canton A: Long-term exposure to high glucose up-regulates VCAM-induced endothelial cell adhesiveness to PBMC. *Kidney Int* 59 (2001) 1842-1849
19. Festa A, Schmölder B, Schernthaner G, Menzel EJ: Differential expression of receptors for advanced glycation end products on monocytes in patients with IDDM. *Diabetologia* 41 (1998) 674-680

20. Fu M-X, Wells-Knecht KJ, Blackledge JA, Lyons TJ, Thorpe SR, Baynes JW: Glycation, glycoxydation, and cross-linking of collagen by glucose. Kinetics, mechanisms and inhibition of late stages of the Maillard reaction. *Diabetes* 43 (1994) 676-683
21. 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 (1998) 275-281
22. Gugliucci A, Bendayan M: Histones from diabetic rats contain increased levels of advanced glycation end products. *Biochem Biophys Res Commun* 212 (1995) 56-62
23. Hofmann MA, Drury S, Caifeng F, Fu C: RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 97 (1999) 889-901
24. Ichikawa K, Nakagawa M, Hirano K, Sueishi K: The localization of tissue factor and apolipoprotein(a) in atherosclerotic lesions of the human aorta and their relation to fibrinogen-fibrin transition. *Pathol Res Pract* 192 (1996) 224-232
25. Ichikawa K, Mototaka Y, Masanori I, Masanori W, Yasufumi D, Kenzo I, Misao Y, Masatoshi F: Advanced glycosylation end products induced tissue factor expression in human monocyte-like U937 cells and increased tissue factor expression in monocytes from diabetic patients. *Atherosclerosis* 136 (1998) 281-287
26. Ishida T, Tanaka K: Effects of fibrin and fibrinogen degradation products on the growth of rabbit aortic smooth muscle cells in culture. *Atherosclerosis* 44 (1982) 161-174
27. Khechai F, Ollivier V, Bridey F, Amar M, Hakim J, de Prost D: Effect of Advanced Glycation End Product-Modified Albumin on Tissue Factor Expression by Monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17 (1997) 2885-2890
28. Kirstein M, Brett J, Radoff S, Ogawa S, Stern D, Vlassara H: Advanced glycosylation end products induce selective monocyte migration across endothelium, and elaboration of growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 (1990) 9010-9014

29. Kirstein M, Aston C, Hintz R, Vlassara H: Receptor-specific induction of insulin-like growth factor I in human monocytes by advanced glycosylation end product-modified proteins. *J Clin Invest* 90 (1992) 439-446
30. Koenig RJ, Peterson CM, Jones RL, Saudek C, Lehrman M, Cerami A: Correlation of glucose hemoglobin A1c in diabetes mellitus. *N Engl J Med* 295 (1976) 417-420
31. Koenig W, Sund M, Frohlich M, Fischer HG, Lowel H, Doring A, Hutchinson WL, Pepys MB: C-reaktive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation* 99 (1999) 237-242
32. Kwaan HC: Changes in blood coagulation, platelet function, a plasminogen-plasmin system in diabetes. *Diabetes* 41 (1992) 32-35
33. 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 (1993) 197-204
34. Li J, Schmidt AM: Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem* 272 (1997) 16498-16506
35. Libby P, Schoenbeck U, Mach F, Selwyn AP, Ganz P: Current concepts in cardiovascular pathology: the role of LDL cholesterol in plaque rupture and stabilization. *Am J Med* 104 (1998) 145-188
36. Libby P, Ridker PM: Novel inflammatory markers of coronary risk: theory versus practice. *Circulation* 100 (1999) 1148-1150
37. Libby P: Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 104 (2001) 365-372
38. Libby P, Ridker PM, Maseri A: Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105 (2002) 1135-1143
39. Luster AD: Chemokines – chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 338 (1998) 436-445

40. Makita Z, Vlassara H, Rayfield E, Cartwright K, Friedman E, Rodby R, Cerami A, Bucala R: Hemoglobin-AGE: a circulating marker of advanced glycosylation. *Science* 258 (1992) 651-653
41. Marx N: Diabetes und Arteriosklerose. *Diabetes und Stoffwechsel* 12 (2003) 205-211
42. Marx N, Froehlich J, Siam L, Ittner J, Wierse G, Schmidt A, März W, Hombach V, Koenig W: Effect of rosiglitazone treatment on soluble CD40L in type-2 diabetic patients with coronary artery disease. *Circulation* 107 (2003) 1954-1957
43. Mattson MP, Rydel RE: Amyloid ox-tox transducers. *Nature* 382 (1996) 674-675
44. Miyata T, Hori O, Zhang JH, Yan SD, Ferran L, Lida Y, Schmidt AM: The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a central mediator of the interaction of AGE-beta-2-microglobulin with human mononuclear phagocytes via an oxidant sensitive pathway. *J Clin Invest* 98 (1996) 1088-1094
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 (1997) 2680-2690
46. Nawroth PP, Bierhaus A, Vogel GE, Hofmann MA, Zumbach M, Wahl P, Ziegler R: Nichtenzymatische Glykierung und oxidativer Streß bei chronischen Erkrankungen und Diabetes mellitus. *Med Klin* 94 (1999) 29-38
47. Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YCE, Elliston K, Stern D, Shaw A: Cloning and expression of RAGE: a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem* 267 (1992) 14998-15004
48. Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, Wilcox JN: Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest* 88 (1991) 1121-1127
49. Njorge FG, Monnier VM: The chemistry of the maillard reaction under physiological conditions: a review. *Prog Clin Biol Res* 304 (1989) 85-107

50. Papoulis A, Youssef A, Bucala R: Identification of N²-(l-carboxyethyl) guanine (CEG) as a guanine advanced glycosylation end product. *Biochemistry* 34 (1995) 648-655
51. Park L, Raman KG, Lee KJ: Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nat Med* 4 (1998) 1025-1031
52. Quehenberger P, Greten J, v-Riedesel J, Ziegler R, Wahl P, Speiser W, Bierhaus A, Nawroth PP: Endothelin-1 is under the control of the transcription factors p50/p65 (NFκB) and AP-1. *Ann Hematol* 70 (1995) 211
53. Raines EW, Ross R: Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *Br Heart J* 69 (1993) 830-837
54. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks F, Braunwald E: Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein. The Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation* 100 (1999) 230-235
55. Ridker PM: Clinical application of C-reactive Protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation* 107 (2003) 363-369
56. Ross R: Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340 (1999) 115-126
57. Ruf W, Edgington TS: Structural biology of tissue factor, the initiator of thrombogenesis in vivo. *FASEB J* 8 (1994) 385-390
58. Rumble JR, Cooper ME, Soulis T, Cox A, Wu L, Youssef S, Jasik M, Jerums G, Gilbert RE: Vascular hypertrophy in experimental diabetes – Role of advanced glycation end products. *J Clin Invest* 99 (1997) 1016-1027
59. Schmidt AM, Yan SD, Brett J, Mora R, Nowygrad R, Stern D: Regulation of human mononuclear phagocyte migration by cell surface-binding proteins for advanced glycation end products. *J Clin Invest* 92 (1993) 2155-2168
60. Schmidt AM, Hasu M, Popov D, Zhang JH, Chen J, Yan SD, Brett J, Cao R, Kuwabara K, Costache G, Simionescu N, Simionescu M, 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 (1994) 8807-8811

61. 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 (1994) 1521-1528
62. Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern DM: Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and arteriosclerosis. *Circ Res* 84 (1999) 489-497
63. Schmidt AM, Stern D: Atherosclerosis and diabetes: The RAGE connection. *Current Atherosclerosis Reports* 2 (2000) 430-436
64. Smith EB: Fibrinogen, fibrin and fibrin degradation products in relation to atherosclerosis. *Clin Haematol* 15 (1986) 353-370
65. Suarez G, Rajaram R, Oronsky AL, Gawinowicz MA: Nonenzymatic glycation of bovine serum albumin by fructose (fructosylation): comparison with the Maillard reaction initiated by glucose. *J Biol Chem* 264 (1989) 3674-3679
66. Takagi Y, Kashiwagi A, Tanaka Y, Asahina T, Kikkawa R, Shigeta Y: Significance of fructose-induced protein oxidation and formation of advanced glycation end products. *J Diabetes Complications* 9 (1995) 87-91
67. Tanaka N, Yonekura H, Yamagishi S: 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 (2000) 25781-25790
68. Vlassara H, Brownlee M, Manogue K, Dinarello C, Pasagian A: Cachectin/TNF and IL-1 induced by glucose-modified proteins: role in normal tissue remodelling. *Science* 240 (1988) 1546-1548
69. Wautier JL, Wautier MP, Schmidt AM, Anderson GM, Hori O, Zoukourian C, Capron L, Chappey O, Yan SD, Brett J, Guillausseau PJ, Stern DM: Advanced glycation end products (AGEs) on the surface of diabetic erythrocytes bind to the vessel wall via a specific receptor inducing oxidant stress in the vasculature: a link between surface-associated AGEs and diabetic complications. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 (1994) 7742-7746

70. Wautier JL, Guillausseau PJ: Diabetes, advanced glycation endproducts and vascular disease. *Vascular Medicine* 3 (1998) 131-137
71. Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM, Gordon D: Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 (1989) 2839-2843
72. Wu JT: Advanced glycosylation end products: a new disease marker for diabetes and aging. *J Clin Lab Anal* 7 (1993) 252-255
73. Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D, Stern D: Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem* 269 (1994) 9889-9897

10. Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben.

Im Besonderen ein großes Dankeschön an meinen Doktorvater Prof. Dr. Nikolaus Marx für die ganz hervorragende Betreuung und dafür, dass er es geschafft hat mich immer wieder zu motivieren.

Vielen Dank an Helga, Miriam und Renate, die mir bei meinen Experimenten jederzeit hilfsbereit zur Seite standen und die immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatten.

Ebenso meinen Dank an Daniel, Nina und Milos für ihre Unterstützung und Aufmunterung während meiner Arbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich beim ganzen Team für die gute Zusammenarbeit und die entspannte und freundliche Atmosphäre in unserem Labor bedanken, die entscheidend dazu beigetragen hat, dass ich trotz aller Widrigkeiten mit meinen Experimenten immer gerne im Labor gearbeitet habe.

Des weiteren möchte ich mich für die Förderung der DFG bedanken, die meine Doktorarbeit im Rahmen des Graduiertenkollegs 460 unterstützt hat.