Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik für Kardiologie und Angiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Mitte (CCM)

DISSERTATION

RAGE-abhängige S100A8- und S100A9-Expression in humanen THP-1 Zellen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Kristin Sikora

aus Bad Saarow - Pieskow

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. V. Stangl

2. Prof. Dr. med. K.-M. Derwahl

3. Priv.-Doz. Dr. med. B. A. Remppis

Datum der Promotion: 20.11.2009

Die Bewegung des Lebens ist Lernen.

Gautama Buddha

INHALT

Abkürzungsverzeichnis ____ **1**

1 Einleitung ____ **3**

1.1 Atherosklerose und ihre systemischen Manifestationen ____ 3

1.2 Diabetes mellitus - Risikofaktor für die Atheroskleroseentstehung ____ 3

1.3 Rolle der Zytokine ____ 4

1.3.1 IL-6 ____ 5

1.3.2 TNFα ____ 5

1.4 Entstehung und Rolle der AGEs ____ 6

1.5 RAGE und seine Liganden ____ 8

1.5.1 Struktureller Aufbau und Vorliegen des Rezeptors ____ 8

1.5.2 RAGE-Liganden-Interaktionen ____ 9

1.6 S100-Proteine ____ 10

1.6.1 Struktur der S100-Proteine ____ 10

1.6.2 Wirkungsweise und Funktionen ____ 12

1.7 Calgranuline S100A8 und S100A9 ____ 12

1.7.1 Struktur und Funktion ____ 13

1.7.2 Signaltransduktion und Sekretion ____ 14

1.7.3 Assoziierte Erkrankungen ____ 14

1.8 Zielsetzung der Arbeit ____ 15

2 Methoden und Materialien ____ **17**

2.1 Zellkultur ____ 17

2.2 Stimulationsversuche ____ 17

2.3 Real Time PCR ____ 22

2.4 ELISA 25
2.5 PAGE und Western Blot 25
2.5.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung 25
2.5.2 Aufarbeitung von Zytoplasma für Proteinfraktionen 26
2.5.3 PAGE 27
2.5.4 Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen 28
2.5.5 Western Blot 29
2.5.6 Unspezifische Proteinfärbung mit Ponceau S 30
2.5.7 Antikörperfärbung von Proteinen auf Blotmembranen 30
2.6 Fotodokumentation 31
2.7 Statistische Auswertung 31
2.8 Geräte, Materialien und Reagenzien 32
3 Ergebnisse 35
3.1 Stimulation mit IL-6 und TNFα 35
3.2 Stimulation mit AGE 40
3.3 Stimulation mit IL-6 und TNFα nach AGE-Vorinkubation 40
3.4 Hemmung des RAGE 45
4 Diskussion 49
4.1 S100A8/S100A9-Expression unter Einfluss von Zytokinen und AGEs 52
4.2 Effekte der AGEs 53
4.3 Wirkung des RAGE-AK 57
4.4 Ausblick 58
5 Zusammenfassung 62
Literaturverzeichnis 63

Abkürzungsverzeichnis

BCA	Bicinchoninsäure
BMI	Body Mass Index
BSA	Bovines Serumalbumin
c	Konzentration
CD	Cluster of differentiation
CML-HSA	Nε-(carboxymethyl)lysine-human serum albumin
CP-10	Chemotactic protein (10 kD)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ddH2O	zweifach destilliertes Wasser
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinasen
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
HMGB1	High mobility group 1 B-box
HUVEC	Human umbilical vein cells
I-κB	inhibitorische κB-Proteine
ICAM-1	interzelluläres Adhäsionsmolekül-1
IL	Interleukin
kDA	Kilodalton
LDL	Low Density Lipoprotein
LFA-1	Lymphozytenfunktion assoziiertes Antigen-1
LPS	Lipopolysaccharid
mAb	Monoklonaler Antikörper
Mac-1	Makrophagen-1 Antigen
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
MCP-1	Monozyten-Chemotaktische-Protein-1
mRNA	messenger RNA
p53	Tumorsuppressorprotein p53
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
Taq	Thermus aquaticus
TMB	3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitant
VCAM-1	vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1
VLA-4	Very late antigen 4
vs.	versus

1 Einleitung

1.1 Atherosklerose und ihre systemischen Manifestationen

Prävalenz und Konsequenzen der Atherosklerose stellen in der Gesellschaft eine noch immer unterbewertete Thematik dar. In den Industrieländern stirbt inzwischen jeder dritte Mensch an einer zerebrovaskulären oder kardialen Erkrankung, weltweit sind 16,7 Millionen kardiovaskuläre Todesfälle pro Jahr zu beklagen (WHO Health Report, 2003). Endotheliale Dysfunktion und chronische Inflammation sind als entscheidende Mechanismen bei der Entstehung der Atherosklerose anzusehen. Geschädigte Endothelzellen werden aktiviert und erhalten proinflammatorische Stimuli. Es folgt die Expression von Zytokinen, Adhäsionsmolekülen und Wachstumsfaktoren (Munro et al., 1988; Ross, 1999). Über Integrinrezeptoren wie LFA-1, Mac-1 oder VLA-4 und vaskuläre endotheliale Liganden wie ICAM-1 und VCAM-1 erfolgt die Monozytenadhäsion an der Gefäßwand. Der Migration der Monozyten durch Endothel und Basalmembran folgen weitere Zytokinfreisetzungen im subendothelialen Raum und ihre Differenzierung zu Makrophagen. Sie akkumulieren über Scavenger-Rezeptoren oxidiertes LDL, werden nun als Schaumzellen bezeichnet und es kommt zur Ausbildung der typischen „fatty streaks“ (Matsumoto et al, 1990; Sampson et al., 2002; Crowther, 2005). Die Manifestationen der Atherosklerose sind vielseitig. Komplikationen treten unter anderem in Form von peripheren arteriellen Verschlüssen (pAVK), Apoplex und der koronaren Herzkrankheit (KHK) auf.

1.2 Diabetes mellitus - Risikofaktor für die Atheroskleroseentstehung

Patienten mit Diabetes mellitus, von denen es im Jahr 2025 voraussichtlich 300 Millionen geben wird, weisen eine höhere Morbidität auf und erfahren häufiger kardiovaskuläre Komplikationen als gesunde Personen (Pyörälä et al., 1987; Zimmet et al., 2001; Beckman et al., 2002). Beach et al. zeigten schon 1982, dass die höchste Prävalenz für die Entwicklung der pAVK bei Rauchern und ausschließlich diätetisch behandelten Diabetikern auftritt, wobei sich die Kombination von beiden Risikofaktoren noch gravierender auswirkt (Beach et al., 1980; 1982).

Pyörälä et al. postulierten 1987, dass nur ein geringer Teil der auftretenden Atherosklerose-Fälle bei Diabetikern durch die Beeinflussung allgemeiner Risikofaktoren erklärt werden kann. Der Hauptteil der atherosklerotischen

Gefäßveränderungen unter diabetischen Bedingungen muss daher in direktem Zusammenhang zum Diabetes stehen (Pyörälä et al., 1987). 1995 entwickelte dagegen Stern die „Common Soil"-Hypothese. Er ging davon aus, dass bei Atherosklerose und Diabetes keiner der beiden Zustände die Ursache oder Bedingung für den anderen darstellt. Vielmehr unterliegen beide Erkrankungen einer gemeinsamen Pathophysiologie und entspringen somit einem „gemeinsamen Boden" (Stern, 1995). Eine Schnittstelle stellen jedoch mit Sicherheit Risikofaktoren, wie falsche Ernährung und daraus resultierendes Übergewicht, Adipositas, Rauchen, Hypertonie oder Bewegungsmangel dar. Deren Vorliegen ist bei etwa 80% der KHK und 90% der Diabetes Typ 2-Fälle zu beobachten (Hu et al., 2003; Hunt et al., 2003). Weiterhin begünstigt ein schlecht eingestellter Diabetes zusätzlich die Entstehung von entzündlichen Plaques, mit gesteigerter Produktion von Zytokinen, welche wiederum oxidativen Stress und endotheliale Dysfunktion induzieren. Folglich ergibt sich eine Verstärkung des atherosklerotischen Prozesses (Sjöholm et al., 2005).

Auch in der Pathogenese der Insulinresistenz und dem Typ-2-Diabetes spielen endotheliale Dysfunktion und subklinische Inflammation eine entscheidende Rolle (Fernandez-Real et al., 2003). Erhöhte Level des C-reaktiven Proteins (CRP) wurden nicht nur im Rahmen der Atherosklerose (Verma et al., 2003), sondern auch beim Diabetes Typ 2 (Sjöholm et al., 2005) gezeigt. Kontrovers wird dagegen die Rolle des Insulins per se diskutiert (Stout, 1990). Hyperinsulinämie konnte einerseits als ein potenziell proatherogener Faktor identifiziert werden (Rönnemaa et al., 1988), andererseits reduziert eine niedrig dosierte Insulingabe in adipösen Patienten die Produktion von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS), CRP und anderen inflammatorischen Markern (Dandona et al., 2004).

1.3 Rolle der Zytokine

Zytokine, eine Gruppe regulatorischer Peptidhormone, entfalten ihre Wirkung überwiegend parakrin. Sie regulieren die Proliferation, Differenzierung und Funktion ihrer Zielzellen. Im Rahmen der Inflammation erfolgt die Expression der Zytokine durch Leukozyten, denen folglich eine wichtige Übermittlerrolle bei der Atherogenese und dem Diabetes Typ 2 zugewiesen wird (Libby et al., 1992). Insbesondere die Zytokine Interleukin 6 (IL-6) und der Tumornekrosefaktor α (TNFα) wurden als entscheidende Mediatoren für atherosklerotische Inflammationsprozesse erkannt. Die Kenntnis ihrer

Wirkungsweise und der von ihnen erfüllten Funktionen sind daher für das Verständnis und umfassendere Untersuchungen der Atherosklerose von Bedeutung.

1.3.1 IL-6

IL-6 ist ein 184 Aminosäuren langes multifunktionelles Zytokin (Fiorillo et al., 1992). Interleukine zeigen unter anderem spezielle mitogene und differenzierende Wirkungen auf Lymphozyten, Makrophagen und andere Zellen. Dabei werden die Effekte des IL-6 offenbar über den Rezeptorkomplex IL-6R vermittelt. Dieser besteht aus einem Liganden bindenden Protein IL-6Rα und der signaltransduzierenden Untereinheit IL-6Rβ oder gP130 (Saadeddin et al., 2002). Produziert wird IL-6 unter anderem von Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Lymphozyten und Makrophagen. Es wirkt pro- und antiinflammatorisch und besitzt zudem prokoagulatorische Eigenschaften.

Eine wichtige Rolle fällt IL-6 als Vermittler in der Pathogenese von koronaren Herzkrankheiten zu. Auch hier werden die Effekte über eine Kombination von autokrinen, parakrinen und endokrinen Mechanismen erzielt. IL-6 findet sich in humanen atherosklerotischen Plaques, sowohl in intrazellulären als auch extrazellulären Ablagerungen. Erhöhte Serumspiegel wurden ebenfalls bei Glukose-Intoleranz und Diabetes mellitus Typ 2 gefunden (Fernandez-Real et al., 2003; Spranger et al., 2003).

Ein weiterer entscheidender Mechanismus ist in der Induktion der hepatischen Akute-Phase-Antwort zu sehen. So wird zum Beispiel die Produktion des CRP induziert, dessen steigender Serumspiegel in direkten Zusammenhang mit der Entstehung akuter koronarer Ereignisse gebracht wird (Ridker et al., 2000). Anscheinend ist IL-6 aber auch selbst als prognostischer Marker für das Myokardinfarktrisiko anwendbar. So weisen erhöhte Serumlevel auf ein gesteigertes Risiko für Myokardinfarkte und das Vorliegen einer instabilen Angina pectoris hin (Saadeddin et al. 2002).

1.3.2 TNFα

TNFα wurde zuerst 1975 als induzierender Serumfaktor der Tumornekrose beschrieben (Carswell et al., 1975). Heute wird TNFα als multifunktionelles, regulatorisches Zytokin erkannt, welches eine wichtige Rolle im Rahmen der Inflammation, Apoptose und dem Überleben von Zellen, aber auch der Produktion von anderen Zytokinen wie IL-1 und

IL-6 einnimmt. Außerdem stimuliert es die Ausschüttung der Akute-Phase-Proteine in der Leber. TNFα gehört zusammen mit Lymphotoxin-α, auch TNFβ genannt, zur TNF/TNFR-Superfamilie (Hehlgans et al., 2005). Seine primär proinflammatorischen Effekte werden über zwei verschiedene Rezeptoren an der Zelloberfläche vermittelt, zum einen über den TNF Rezeptor I (P55) und zum anderen über den TNF Rezeptor II (P75) (Saadeddin et al., 2002). Ruan et al. postulieren dabei den nukleären Transkriptionsfaktor kappa B (NF-kB) als erforderlichen Mediator der TNFα Antwort (Ruan et al., 2002).

TNFα wird von Monozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten, Fibroblasten und glatten Muskelzellen produziert. Adipozyten stellen jedoch anscheinend den vorherrschenden Produktionsort für TNFα dar, dessen Expression sich bei übergewichtigen Menschen und Tieren erhöht zeigt (Hotamisligil et al., 1993; 1995). Generell werden dem Fettgewebe außer seiner Speicherfunktion inzwischen auch weit reichende endokrinologische und sekretorische Funktionen zugewiesen (Trayhurn et al., 2001; Ruan et al., 2003). Spranger et al. zeigten erhöhte TNFα-Level beim Vorliegen eines Diabetes Typ 2, ähnlich wie für IL-6 beschrieben. Die Prädisposition war allerdings nicht mehr signifikant erhöht nach Einbeziehung der BMI und Waist-to-Hip-Ratio-Werte (Spranger et al., 2003), womit die gesteigerte TNFα-Expression eher Antwort auf den adipösen Ernährungszustand zu sein scheint. Ruan et al. benannten dennoch TNFα als den potenziellen Mediator, der das Verbindungsglied zwischen Adipositas und Insulinresistenz darstellt (Ruan et al., 2003).

1.4 Entstehung und Rolle der AGEs

Advanced Glycation End Products (AGEs) stellen eine heterogene Gruppe reaktiver, kreuzvernetzter Produkte dar, welche durch die nicht-enzymatische irreversible Reaktion von reduzierenden Kohlenhydraten mit Aminogruppen von Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren gebildet werden. Sie entstehen im Rahmen von Alterungsprozessen und durch langfristige Hyperglykämie. Folglich sind sie in erhöhter Plasmakonzentration bei Patienten mit Diabetes mellitus zu finden (Makita et al., 1992; Cerami et al., 1997).

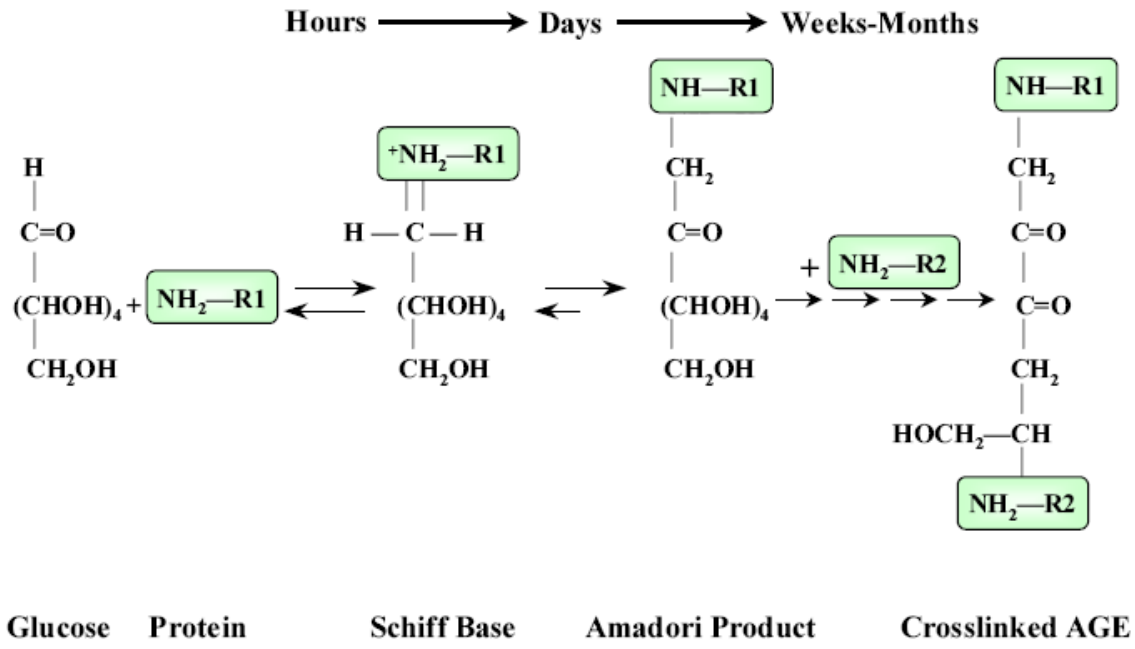


Abbildung 1-1: Die Bildung von AGEs

Reduzierende Zucker bilden zunächst reversibel mit reaktiven Aminogruppen zirkulierender oder gefäßwandgebundener Proteine Schiffsche Basen. Diese werden anschließend in einer länger andauernden Reaktion zu den stabileren Amadori-Typ-Glykosylierungsprodukten umorganisiert. Einige dieser Produkte, die zum Beispiel an Gefäßwandkollagene gebunden sind, unterziehen sich einer weiteren komplexen Serie von Glykierungsprozessen und formieren sogenannte Advanced Glycation End Products. Diese sind stabil und praktisch irreversibel.

(Abbildung übernommen aus Aronson und Rayfield, 2002)

In Extrakten von Tabak und Tabakrauch finden sich ebenfalls reaktive Kohlenhydrate, die sich mit Serum- und Gefäßwandproteinen zu AGEs verbinden können. Damit zeigt die Verbrennung von Nikotin in Zigarettenrauch eine exogene Möglichkeit der AGE-Enstehung auf, im Gegensatz zu den endogenen Mechanismen wie bei Diabetes mellitus. In einer Studie konnte in Bezug auf diese Erkenntnis belegt werden, dass AGE-Level bei Rauchern signifikant erhöht sind (Cerami et al., 1997).

AGEs vermitteln ihre Effekte unter anderem über den Rezeptor für Advanced Glycation End Products (RAGE), dem diverse Signaltransduktionskaskaden nachgeschaltet sind. Diese münden beispielsweise in der Generierung von ROS und können bei unzureichendem Angebot an Radikalfängern und Antioxidantien zu oxidativem Stress in der Zelle führen (Tan et al., 2007).

Im Gegensatz zu RAGE binden Scavenger Rezeptoren zwar ebenfalls AGEs, jedoch erfolgt hierdurch eine Eliminierung von AGEs aus dem Kreislauf (Takata et al., 1988).
AGEs stehen in Verdacht, die Progression von Gefäßerkrankungen bei Patienten mit Diabetes oder Nephropathien zu fördern. Ein interessanter Aspekt erscheint folglich die Wirkung von AGE-Inhibitoren.

1.5 RAGE und seine Liganden

Der Rezeptor für Advanced Glycation End Products (RAGE) ist Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie und wurde ursprünglich als Interaktionspartner für AGE-modifizierte Moleküle auf Endothelzellen identifiziert (Schmidt et al., 1992; Neeper et al., 1992). Er wird aber auch in zahlreichen anderen Zellen, unter anderem Mononukleären Phagozyten, Mesangialzellen und in glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert (Brett et al., 1993).

Auffällig ist die gesteigerte Expression des Rezeptors selbst, als Antwort auf das Vorhandensein von Liganden in der Umgebung. Die NF-κB-Bindung an den RAGE-Promotor scheint dabei ursächlich an der Hochregulation der RAGE-Expression beteiligt zu sein (Li et al., 1997). An Stellen akkumulierter AGEs im Gefäßsystem findet sich folglich eine erhöhte Expression des Rezeptors in den Endothel- und glatten Muskelzellen der Gefäßwände. Schmidt et al. vertreten dabei ein Zwei-Phasen-Modell der zellulären Störung. Die Bindung von RAGE und seinen Liganden kann als „First Hit“ bezeichnet werden. Dabei wird die Präsenz der Liganden im Gewebe durch unzureichende endogene Clearance-Mechanismen begünstigt. Der „Second Hit“ wird schließlich durch zusätzliche Akkumulation von modifizierten Lipoproteinen, eindringende bakterielle Pathogene, ischämischen Stress und andere Faktoren vermittelt (Schmidt et al., 2000).

1.5.1 Struktureller Aufbau und Vorliegen des Rezeptors

RAGE besteht aus einer extrazellulären Domäne, einer transmembranen Domäne und einem 43 Aminosäuren langen zytosolischen Endstück. Der extrazelluläre Teil umfasst drei Immunglobulin (IG)-ähnliche Regionen. Zum einen handelt es sich dabei um eine n-terminal gelegene V-Domäne. Wahrscheinlich ist dieser variable Teil für die Bindung der Liganden zuständig. Zwei C-Domänen, welche den konstanten Domänen der IGs ähneln, stabilisieren den Komplex.

RAGE liegt sowohl als membranständiger Rezeptor vor als auch in sezernierbarer Form ohne transmembrane Domäne. Die Synthese dieser Isoform, wegen ihrer Löslichkeit auch als soluble RAGE (sRAGE) bezeichnet, wird durch alternatives Spleißen bedingt (Malherbe et al., 1999). Fehlt nur der dem transmembranen Teil anliegende zytosolische Ausläufer, ist die Induktion der zellulären Aktivierung gestört. Diese sogenannte DN-RAGEs, Rezeptoren denen der zytosolische Teil fehlt, bewirken selbst bei vorhandenen RAGEs vom Wildtyp eine Inaktivierung dieser intakten Rezeptoren (Hofmann et al., 1999; Schmidt et al., 2000).

1.5.2 RAGE-Liganden-Interaktionen

RAGE zeigt außer der AGE-Bindung eine Affinität zu zahlreichen Liganden. So wurden Interaktionen mit β-Faltblatt-Fibrillen, Amyloid A, Amyloid-β Peptiden und Prion Peptiden beschrieben. Auch Amphoterine, DNA-bindende Proteine, wurden als Bindungspartner für RAGE erfasst. S100-Proteine sind ebenfalls in die RAGE-Aktivierung involviert (Hofmann et al., 1999). S100A12, Mitglied der S100-Protein-familie, wird auch als extracellular newly identified RAGE binding protein (EN-RAGE) bezeichnet. Dabei kommen in der Lunge die größten physiologischen Ansammlungen von RAGE-Antigenen wie S100A12 und S100B vor (Schmidt et al. 2000; 2001). Aber auch in atherosklerotischen Plaques von Diabetikern finden sich neben inflammatorischen Zellinfiltraten vermehrt RAGE-exprimierende glatte Muskelzellen und Makrophagen mit erhöhten Apoptoseraten. Folglich entstehen mehr Nekrosen im Inneren der Plaques. Burke et al. postulierten dabei eine Verbindung der erhöhten RAGE- und S100A12-Expression zur verstärkten Apoptose (Burke et al., 2004).

Die Bindung von AGEs, S100-Proteinen oder auch Amyloid-β an RAGE bedingen unter anderem eine Aktivierung von NF-κB. Es kommt weiterhin zur Aufrechterhaltung dieser Aktivierung durch gesteigerte Synthese der NF-κB-Proteine und Senkung der I-κB-Konzentration (Bierhaus et al., 2001). Der genaue Weg der Signaltransduktion ist noch nicht abschließend geklärt. Unter anderem führt die Aktivierung von RAGE durch AGE-Albumin zur Auslösung des p21ras-abhängigen MAP-Kinase-Weges (Lander et al., 1997). Auch Yeh et al. erkannten bei Untersuchungen an THP-1 Zellen, dass die Bindung von CML-HSA an RAGE zur transkriptionellen Aktivierung von NF-κB und der Sekretion proinflammatorischer Zytokine führt. Die Signalkaskade läuft hierbei über die Phosphorylierung von p38 und ERK 1/2 MAP-Kinasen (Yeh et al., 2001).

Weiterhin schließt das Prinzip der RAGE-vermittelten zellulären Stimulation die schon beschriebene erhöhte Expression des Rezeptors selbst ein. Schmidt et al. beschreiben daher als einzige Möglichkeit der Herunterregulierung von RAGE die Unterbrechung der Ligandenbindung durch sRAGEs oder anti-Rage-IgG. Demzufolge wurden Blockierversuche auch unter klinischen Aspekten durchgeführt. Dabei ergaben viel versprechende Experimente, dass RAGE-Blockaden oder der Einsatz von löslichen RAGEs sich günstig auf diabetische Nephropathien, parodontale Erkrankungen, Allergien vom verzögerten Typ und Atherosklerose auswirken (Park et al., 1998; Schmidt et al., 2000; Kislinger et al., 2001).

1.6 S100-Proteine

S100-Proteine wurden erstmals 1965 beschrieben und repräsentieren die größte Untergruppe der calciumbindenden EF-Hand-Proteine. Sie werden sowohl extrazellulär als auch im Zytoplasma und im Zellkern gefunden und stellen, wie schon beschrieben, ebenfalls Liganden des RAGE dar. Bis heute wurden 25 Mitglieder dieser Proteinfamilie beschrieben. Auffällig ist dabei die Homologie der S100-Proteine untereinander, so beträgt die Identität der Aminosäurezusammensetzung 25-65%. Interessanterweise sind mindestens 21 der S100-Gene in einem engen Cluster auf Chromosom 1q21 angeordnet (Santamaria-Kisiel et al., 2006). Die Nomenklatur der Proteine orientiert sich deshalb an der Lokalisierung ihrer Gene auf diesem Cluster (Schäfer et al., 1995). Chromosomenanomalien können hier folglich zur dysregulierten Expression gleich mehrerer S100-Proteine führen und werden mit Neoplasien assoziiert (Schäfer et al., 1996).

1.6.1 Struktur der S100-Proteine

Charakteristisch für S100-Proteine ist ihr geringes Molekulargewicht um 10-12 kDA und das Vorkommen von EF-Hands. Diese sind nach der E- und F-Helix des Parvalbumins benannt, welches ebenfalls hochselektiv und mit hoher Affinität Ca^{2+} bindet. Bei jedem S100-Monomer finden sich zwei ausgeprägte EF-Hands mit angrenzenden hydrophoben Ausläufern. Jede EF-Hand besteht dabei wiederum aus zwei α-Helices und einem verbindenden Ca^{2+}-bindenden Loop. Die carboxy-terminale EF-Hand enthält Helix III und IV und einen kanonischen Ca^{2+}-bindenden Loop aus 12 Aminosäuren. Der amino-terminale Loop besteht aus 14 Aminosäuren und weist eine 100-fach geringere

Affinität für Calcium auf, assoziiert finden sich hier Helix I und II (Schäfer et al., 1996; Santamaria-Kisiel et al., 2006). Verbunden werden die EF-Hands durch eine zentrale Gelenkregion. S100-Mitglieder unterscheiden sich voneinander hauptsächlich durch die Länge und Sequenz dieser sogenannten Hinge-Region und des C-terminalen Ausläufers.

Von Donato et al. wurde postuliert, dass die Interaktion der S100-Proteine mit ihren Zielproteinen vermutlich über eine Konformationsänderung der C-terminalen EF-Hand ermöglicht wird. Durch Calcium-Bindung wird Helix III senkrecht zu Helix IV angeordnet, die Gelenkregion schwingt auf und eine Spalte formiert sich. Diese ist in Zusammenhang mit der Gelenkregion, Helices III und IV und dem C-terminalen Ausläufer entscheidend für die Erkennung und Interaktion mit den Zielproteinen.
Als Ausnahme bindet S100A10 kein Ca^{2+} und unterzieht sich keiner calciuminduzierten Formationsänderung. Es existiert in einer immer aktivierten Konformation (Donato, 1999).

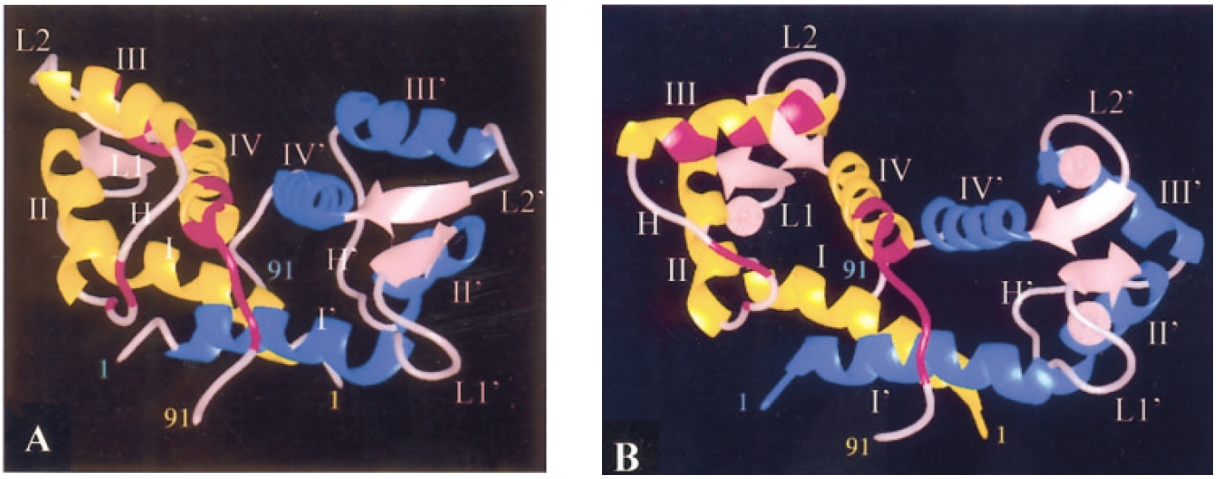


Abbildung 1-2: Konformationsänderung der S100-Dimere bei Calciumbindung
Beispielhaft ist S100B dargestellt, in Ca^{2+}-freier (A) und –gebundener Form (B). Die Helices der Monomere sind bezeichnet mit I-IV, bzw. I'-IV', die Ca^{2+}-Ionen sind rosa gefärbt (L1, L2, L1', L2'). Die Bindung von Calcium verursacht eine Umorientierung von Helix III und der Hinge-Region. Die nun erfolgte Exposition der hier lila gefärbten Oberfläche ermöglicht die Interaktion mit Bindungspartnern (Drohat et al., 1998; Donato et al., 2003). (Abbildung übernommen aus Donato et al., 2003)

Über 90 Proteine wurden bisher als Zielproteine für S100-Mitglieder identifiziert, darunter unter anderem die zytoskelettalen Proteine F-Actin und Tubulin. Neben RAGE und Scavenger Rezeptoren werden vermutlich noch weitere, bislang unbekannte Rezeptoren angesteuert (Kerkhoff et al., 2001; Donato, 2003; Sorci et al., 2004).

1.6.2 Wirkungsweise und Funktionen

S100-Proteine kommen nicht ubiquitär vor, sondern werden gewebsspezifisch exprimiert. Letztlich kontrollieren sie jedoch ähnliche Prozesse in den ihnen charakteristischen Geweben (Santamaria-Kisiel et al., 2006).

Eine Besonderheit dieser Proteinfamilie besteht in der Fähigkeit, Homo- und Heterodimere sowie höher geordnete Komplexe zu formieren. Monomere werden dabei durch nonkovalente Bindungen zu Homodimeren zusammengehalten. Durch die Dimerisierung wird eine Vernetzung von homo- oder heterologen Zielproteinen möglich (Donato et al., 2003; Santamaria-Kisiel et al., 2006).

Aufgabe der S100-Proteine ist unter anderem die Umsetzung eines Ca^{2+}-Anstiegs in die zelluläre Antwort mittels Beeinflussung von Signaltransduktionskaskaden. Ihr Angriffspunkt liegt hier in der Interaktion mit Kinase-Substraten. Beispielhaft sei die Inhibition der Phosphorylierung von Caldesmon und p53 durch S100B genannt. Somit wird eine Feinregulation im Zuge der Signaltransduktion ermöglicht.

Für S100-Proteine wurde bisher keine enzymatische Aktivität beschrieben. Ihre Substrate können jedoch Enzyme sein, deren Aktivitäten sie modulieren. Letztlich führt ihre Wirkung zur Regulierung intrazellulärer Prozesse wie Zellwachstum und Differenzierung. Auch die Aufrechterhaltung von Zellform und Motilität sowie die Calcium-Homöostase werden durch S100-Proteine unterstützt. Neben intrazellulären Aufgaben erfüllen sie auch eine Vielzahl von extrazellulären, Ca^{2+}-abhängigen sowie Ca^{2+}-unabhängigen Funktionen. Ferner wurden unter anderem S100A4, S100A6, S100A7 und S100B in verschiedenen Tumorzellen hochreguliert gefunden (Schäfer et al., 1996; Donato, 1999).

1.7 Calgranuline S100A8 und S100A9

Die Antwort von Monozyten und neutrophilen Granulozyten auf Chemotaktika gilt als wichtiger Schritt in der Atherogenese. An der Monozytenrekrutierung zu den Orten der Inflammation sind nach jüngeren Erkenntnissen S100A8 und S100A9, zwei Mitglieder der S100-Proteinfamilie, beteiligt. Beeindruckend stellt sich ihr zytosolischer Proteinanteil dar, welcher bei Neutrophilen ungefähr 45% und bei Monozyten etwa 1% beträgt. Ihre Expression wird in frühen Differenzierungsstadien von Monozyten und bei

deren Infiltration, jedoch nicht mehr in ortsständigen Gewebsmakrophagen beobachtet (Odink et al., 1987; Hessian et al., 1993).

1.7.1 Struktur und Funktion

S100A8 und S100A9 sind auch als Calgranuline sowie als Myeloid Related Proteine MRP8 (S100A8) und MRP14 (S100A9) bekannt. Sie bilden über nichtkovalente Assoziation einen heterodimeren Komplex von 34 kDA (Siegenthaler et al., 1997). Ebenso treten Formierungen zu $S100A8_2$/S100A9 Trimeren und $S100A8_2$/$S100A9_2$ Tetrameren auf (Donato, 1999). Für das Heterodimer herrscht, besonders in Gegenwart von Ca^{2+}, eine strenge Präferenz. Es stellt das am besten beschriebene Heterodimer der S100-Proteine dar und wird als die funktionell relevante Form von S100A8 und S100A9 betrachtet (Santamaria-Kisiel et al., 2006). So weist nur der Heterodimerkomplex eine hohe Affinität für die reversible Bindung ungesättigter Fettsäuren auf (Siegenthaler et al., 1997). Diese Komplexierung von S100A8 und S100A9 mit ungesättigten Fettsäuren könnte modulierend auf die proinflammatorische Aktivität von Arachidonsäure wirken oder über Membrantranslokation des Heterodimers ein Teil seines Sekretionsprozesses sein (Donato, 1999). Auch Kerkhoff beschreibt in Bezug auf die Bindung von ungesättigten Fettsäuren die beiden S100-Proteine als wichtigen Mediator zwischen Calcium-Signalkaskaden und Arachidonsäure-Effekten (Kerkhoff et al., 1999).

CP-10 (murines S100A8) wirkt als Chemoattraktans auf Neutrophile und Monozyten (Lackmann et al., 1993). Folglich führt dies zu einer verstärkten Rekrutierung der Leukozyten. Speziell in den Monozyten kommt es aber auch zu erhöhter LDL-Akkumulation und Expression von Scavenger-Rezeptoren (Lau et al., 1995).

Hobbs et al. untersuchten S100A9(-/-)-Mäuse und wiesen S100A8-mRNA, jedoch kein Protein nach. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Stabilität von S100A8 nur zusammen mit S100A9 gegeben ist. Sie fanden weiterhin den Ca^{2+}-Anstieg nach Stimulation mit dem Makrophagen inflammatorischen Protein-2 (MIP-2) in niedrigen Konzentrationen zwar beeinträchtigt, die chemotaktische Antwort aber insgesamt unbeeinflusst. Ebenso verhielten sich auch Phagozytose, Apoptose und Inflammation am in vivo-Modell der Peritonitis unauffällig. S100A8/A9 scheint daher involviert, jedoch entbehrlich für die myeloischen Zellfunktionen (Hobbs et al, 2003).

1.7.2 Signaltransduktion und Sekretion

Über Signalwege, die durch S100A8 und S100A9 aktiviert werden, liegen noch wenige Erkenntnisse vor. Donato schildert die Modulation der Aktivität der Casein-Kinasen I und II durch das S100A8/A9-Heterodimer, welche wiederum die Topoisomerase I und die RNA-Polymerasen I und II phosphorylieren. Daraus folgend ergibt sich eine potenzielle Rolle von S100A8/A9 in der Regulation der myeloischen Zellreifung und Funktion (Donato, 2003).

An Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (HUVECs) konnte eine verstärkte Sekretion von IL-6 und MCP-1 sowie der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1, nach AGE-Vorbehandlung und Stimulation mit dem S100A8/A9-Heterodimer nachgewiesen werden. In den Signaltransduktionsweg sind dabei die MAP-Kinasen ERK1/2 und p38 involviert und münden schließlich in einer Aktivierung von NF-κB (Ehlermann et al., 2006). Die Phosphorylierung von MAP-Kinasen und eine Aktivierung von NF-kB zeigten auch Hermani et al. für humane Prostatakarzinom-Zellen (Hermani et al., 2006).

Eine Sekretion von S100-Proteinen wurde bis jetzt nur für S100B und S100A8/A9 dokumentiert. Der zugrunde liegende Mechanismus bleibt noch vollständig zu klären, ist bei S100A8/A9 jedoch abhängig von einem intakten mikrotubulären Netzwerk (Rammes et al., 1997). Zu ihren extrazellulären Funktionen gehört die zytostatische Aktivität gegenüber Bakterien und Pilzen. Weiterhin fördert freigesetztes S100A8/A9 die CD11b-Expression und die schon beschriebene Rekrutierung von Monozyten zu Orten der Inflammation (Donato, 2003).

1.7.3 Assoziierte Erkrankungen

In Zusammenhang mit der Ätiologie der zystischen Fibrose wurde zunächst vermutet, dass das Heterodimer aus S100A8/A9 ursächlich an der Krankheit beteiligt ist und bezeichnete es daher als Cystic Fibrosis Antigen (CFA). Erst später wurde die Fehlfunktion des Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)-Proteins als entscheidender Mechanismus erkannt. Gleichwohl finden sich erhöhte Expressions- und Serumlevel von S100A8/A9 bei diesem Krankheitsbild (Barthe et al., 1991; Roth et al., 1992).

Zahlreiche weitere entzündliche Erkrankungen wurden bis heute gefunden, die im Zusammenhang mit den beiden Calgranulinen S100A8 und S100A9 stehen. So konnten erhöhte Serumkonzentrationen bei Patienten mit rheumatischer Arthritis (Berntzen et al., 1991; Frosch et al., 2000), chronischer Bronchitis (Roth et al., 1992), systemischem Lupus erythematodes (Haga et al., 1993), aber auch granulomatösen Entzündungen wie Tuberkulose und Sarkoidose (Pechkovsky et al., 2000) nachgewiesen werden. Strasser et al. zeigten, dass bei HIV-Patienten die S100A8/A9-Werte ebenfalls erhöht sind und eine Korrelation zur Anzahl der CD4-T-Helferzellen besteht (Strasser et al., 1997). Ähnlich wie andere S100-Proteine scheinen auch S100A8 und S100A9 mit Neoplasien assoziiert zu sein. So konnten Young et al. nachweisen, dass die beiden Proteine an Invasionsprozessen und der malignen Progression von Magenkarzinom-Zellen funktionell beteiligt sind (Yong et al., 2007).

Das Verständnis für Atherosklerose als entzündliche Erkrankung wies auch S100A8 und S100A9 eine potenzielle Rolle im Rahmen der Gefäßerkrankungen zu. McCormick et al. wiesen beide Proteine in humanen Plaques nach. Atherosklerotische Gefäße zeigten dabei in hohem Maße S100A8-positive Makrophagen und Schaumzellen, während S100A9 offenbar besonders in verkalkenden Bereichen exprimiert wird. T-Lymphozyten und glatte Muskelzellen zeigten dagegen keine S100A8/A9-Expression (McCormick et al., 2005)

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Atherosklerose und Diabetes mellitus sind komplexe, in wechselseitiger Beziehung stehende chronisch entzündliche Erkrankungen. Erhöhte Zytokinlevel sind ebenso belegt wie die Generierung von nicht-enzymatischen Glykierungsprodukten (AGEs) unter diabetischen Bedingungen. In jüngster Zeit erkannte man außerdem den Zusammenhang zwischen dem proinflammatorischen Heterodimer aus S100A8 und S100A9 und dem Vorkommen entzündlicher atherosklerotischer Plaques. AGEs können unter anderem zu oxidativem Stress in der Zelle führen und für RAGE wurde ein Zusammenhang zu entzündlichen Gefäßerkrankungen bereits nachgewiesen. Somit begünstigt die Generierung von AGEs vermutlich das Auftreten von S100A8/A9 im Rahmen atherosklerotischer Prozesse. Am Endothel wurde beispielsweise für S100A8/A9 unter AGE-Einfluss bereits eine Aktivierung von NF-κB über MAP-Kinasen

und schließlich eine verstärkte Sekretion von proatherogenen Markern wie IL-6, ICAM-1 und VCAM-1 gezeigt.

Ziel dieser Arbeit ist es, das am Endothel gewonnene Modell weiterzuführen. Dabei soll die Frage beantwortet werden, welche Bedingungen zur gesteigerten Expression von S100A8/A9 in den peripheren Zellen des Immunsystems führen und so die Grundlage für die pathophysiologischen Mechanismen am Endothel schaffen. Da ein Zusammenhang zwischen atherosklerotischen Prozessen und dem Auftreten von IL-6 sowie TNFα bereits vielfach hergestellt wurde, sollen auch hier diese beiden Zytokine als proinflammatorische Stimuli wirken. Untersucht werden soll außerdem der potenzielle Einfluss von AGEs über RAGE auf die S100A8/A9-Expression. Einen entscheidenden Aspekt stellen schließlich Angriffspunkte dar, die Inhibitionsmöglichkeiten aufzeigen und so das Modell letztlich erst klinisch relevant machen.

Da die Monozytenadhäsion am Endothel einer der frühen notwendigen Schritte in der Atherogenese ist und S100A8/A9 in hohem Maße von Monozyten bei ihrer Infiltration exprimiert wird, wurden für die laborexperimentellen Untersuchungen THP-1 Zellen gewählt. Diese Zelllinie weist ausgeprägte Monozyten-Marker auf und gilt als adäquates Modell humaner Monozyten (Ding et al., 2007). Sie eignen sich für laborexperimentelle Untersuchungen, während dagegen Zellen aus humanen Blutpräparaten nur begrenzt verfügbar sind und individuelle Variabilitäten aufweisen.

2 Methoden und Materialien

2.1 Zellkultur

Für die Zellkultur wurden humane THP-1-Zellen der Fa. ATCC verwendet. Diese entstammen einer humanen leukämischen Zelllinie aus der peripheren Blutbahn eines Patienten mit akuter Monozytenleukämie (Tsuchiya et al., 1980).

Die Kultivierung der Suspensionszellen erfolgte stehend im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO_2 in 25 cm^3-Zellkulturflaschen. Als Kulturmedium wurde RPMI 1640 mit 10 % Fetal Bovine Serum (FBS) und 1 % Penicillin / Streptomycin (PenStrep) verwendet. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2 Tage. Bei einer Zellzahl von $1x10^6$ Zellen/ml wurden die Zellen nach Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min in 4 Subkulturen überführt.

Kulturmedium

RPMI 1640 + 50 ml (10 %) FBS (inaktiviert)
+ 5 ml (1 %) PenStrep

2.2 Stimulationsversuche

Vor der Stimulation wurden die THP-1-Zellen nach Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min im Stimulationsmedium aufgenommen. Es erfolgte ein Vitalitätstest mit Erythrosin B-Lösung, der Anteil vitaler Zellen sollte dabei 98 % nicht unterschreiten.

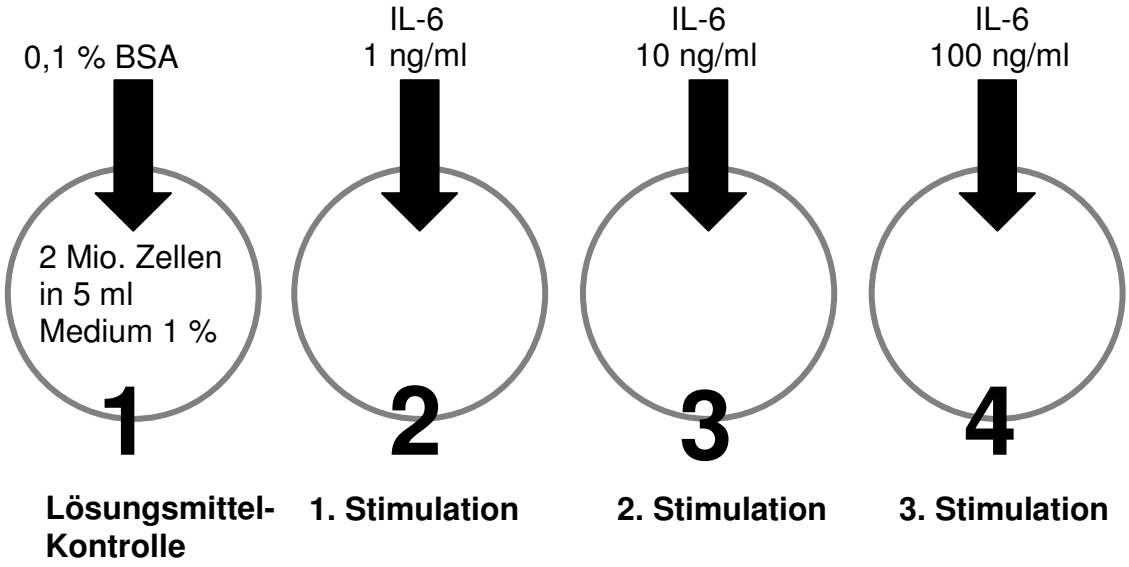
Die Zellen wurden in 60x15 mm Gewebekulturschalen in einer Dichte von $2x10^6$/5 ml ausplattiert, der Inhibitionsversuch mit dem RAGE-Antikörper erfolgte in analoger Dichte auf 6-Well-Platten. Anschließend wurden die Zellen vor der Stimulation für 1 h im Brutschrank inkubiert.

Die Zellsuspension wurde nach Ablauf der Stimulationszeit bei 2000 rpm für 5 min zentrifugiert und die Überstände in Eppendorfgefäße aliquotiert. Das Waschen der Zellpellets erfolgte in 1 ml Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS). Die Überstände und Zellpellets wurden separat bei -80 °C asserviert.

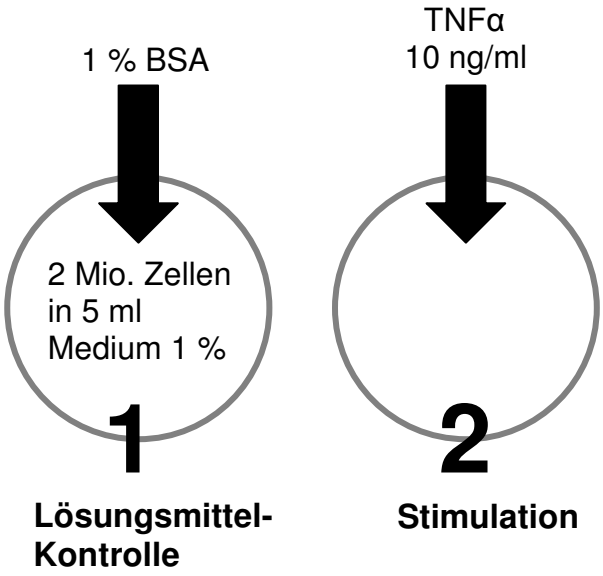
Stimulationsmedium

RPMI 1640 + 5 ml (1 %) FBS (inaktiviert)
+ 5 ml (1 %) PenStrep

Versuchsaufbau Stimulation mit IL-6



Versuchsaufbau Stimulation mit TNFα



AGE-Synthese

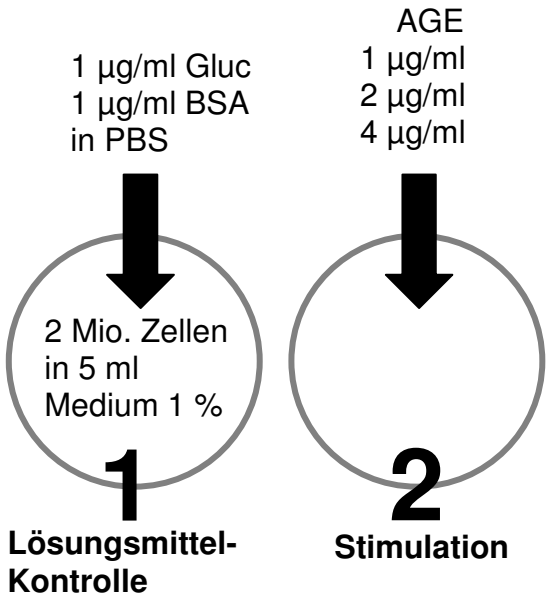
Für die Stimulation mit Advanced Glycation End Products wurden diese nach dem Protokoll von Bierhaus synthetisiert (Bierhaus et al., 1997). Es erfolgte die Inkubation von 1 g BSA in 10 ml PBS mit 0,5 M Glucose (Gluc) für 6 Wochen bei 37 °C. Zusätzlich wurden 2 µl/ml PMSF, 2,5 mM EDTA sowie 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin hinzugegeben. Im Anschluss erfolgte die sterile Filtration.

Der Nachweis der biologischen Aktivität der AGEs erfolgte im One Stage Clotting Assay mit humanen Endothelzellen (Fa. Dade Behring). Das Prinzip dieses Tests beruht darauf, dass AGEs zu einer Aktivierung der Endothelzellen führen. Bei aktivierten Endothelzellen wird durch erhöhte Tissue Factor-Expression eine um mehr als 50 % reduzierte Gerinnungszeit gegenüber ruhenden Endothelzellen beobachtet (Visseren et al., 2000). Somit kann über die Messung der Gerinnungszeit der prokoagulatorische Effekt und damit die Aktivität der AGEs belegt werden.

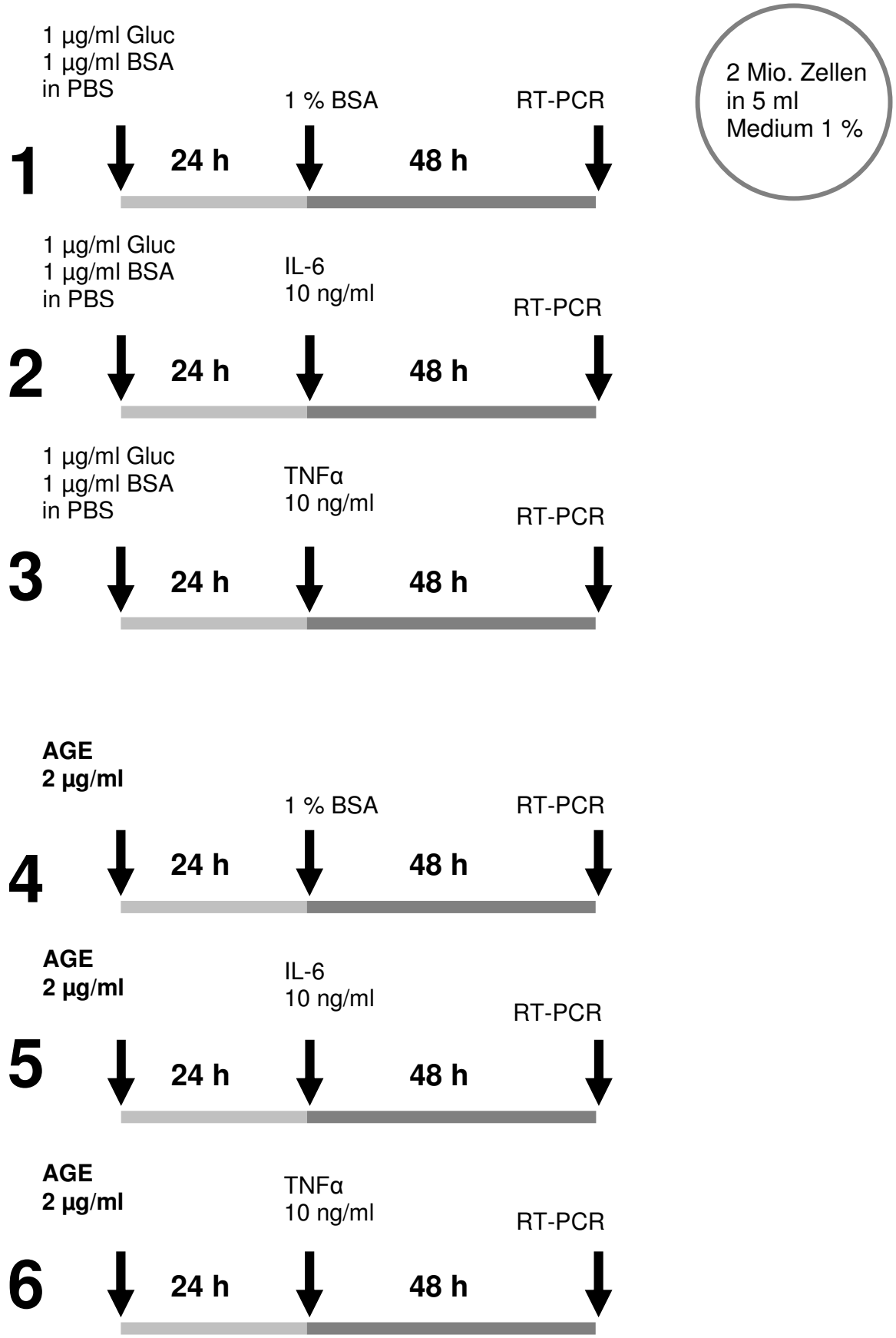
Reagenzien und Ansatzprotokoll

- 3-maliges Spülen der Zellkultur mit PBS,
- nicht-enzymatisches Ablösen der Zellen,
- Abzentrifugieren der Zellen bei 5000 rpm für 5 min,
- Suspendieren des Zellpellets in 100 µl Barbitalpuffer, (Natriumbarbital 38 mmol/l, NaCl 125 mmol/l, pH 7,35),
- Zugabe von 100 µl zitriertem Normalplasma,
- Starten der Reaktion mit 100 µl $CaCl_2$ 25 mM,
- Messung der Zeit bis zum Fibrinausfall bei 37 °C im Wasserbad.

Versuchsaufbau Stimulation mit AGE

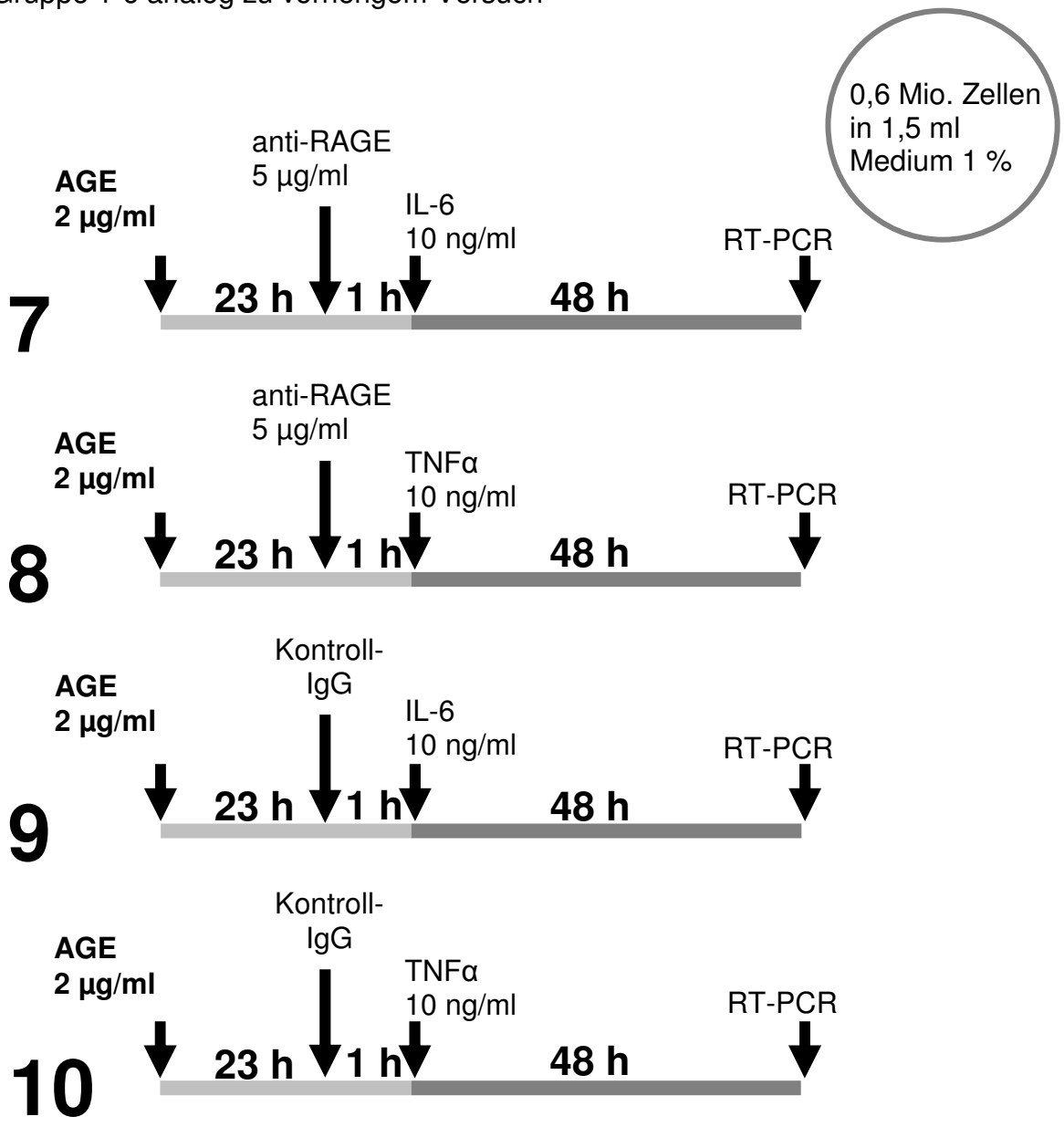


Versuchsaufbau AGE-Vorstimulation mit anschließender IL-6 / TNFα-Stimulation



Versuchsaufbau AGE-Vorstimulation mit anschließender anti-RAGE-Inhibition

Gruppe 1-6 analog zu vorherigem Versuch



2.3 Real Time PCR

Prinzip der mRNA-Bestimmung

Nach Extraktion der RNA muss zuerst deren Konzentration in den Proben ermittelt werden. Bei der Probenvermessung wird die charakteristische Absorption von RNA in Lösung ausgenutzt. Im Spektralphotometer erfolgt die Bestimmung der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm. Im Anschluss daran wird die RNA-Konzentration der Probe über die Formel $c=40 \times Absorption_{260nm} \times Verdünnungsfaktor$ berechnet. Zusätzlich kann über den Quotient $Absorption_{260nm}/Absorption_{280nm}$ der Reinheitsgrad der Probe überprüft werden. Dieser beträgt zwischen 1,6 und 2,0. Ein höherer Quotient weist auf einen höheren Reinheitsgrad hin.

Im nächsten Schritt wird die vorhandene mRNA in komplementäre DNA (cDNA) transkribiert. Die Reverse Transkriptase eines murinen Leukämie-Virus katalysiert diese Reaktion (MMLV RT). Anschließend kann die gewonnene cDNA im PCR-Vorgang amplifiziert werden. Dabei wird mit Hilfe von spezifischen Primern die zu amplifizierende DNA-Sequenz festgelegt und um das 2^n-fache vervielfältigt, wobei n die Anzahl der PCR-Zyklen angibt.

Der Vorteil der Real Time PCR (RT-PCR) besteht nun in der Möglichkeit, die vervielfältigte DNA gleichzeitig auch quantifizieren zu können. Dazu werden spezifische Sonden eingesetzt, die mit den Genen hybridisieren. Die Sonden sind mit jeweils 2 Fluoreszenzmarkern gekoppelt, einem Reporter und einem Quencher. Der Quencher verhindert durch die Nähe zum Reporter dessen Emission eines Lichtes bestimmter Wellenlänge. Werden jedoch während der PCR die DNA-Abschnitte abgelesen, zerstört die Taq-Polymerase durch ihre 5'-3'-Exonukleaseaktivität die Sonden. Der Quencher verliert seinen Kontakt zum Reporter und dieser beginnt zu fluoreszieren. Dies geschieht proportional zur Menge an spezifischem PCR-Produkt. Das Taqman-Gerät registriert, bei wie vielen Zyklen ein definierter Schwellenwert an Fluoreszenz überschritten wird. Dieser so genannte Schwellenwert-Zyklus wird als CT-Wert bezeichnet.

Arbeitsschritte

Zunächst wurde die RNA der humanen THP-Zellen nach folgendem Protokoll extrahiert:

1. Lösung des Zellpellets in 1 ml Trizol und Inkubation für 5 min bei 15-30 °C,
2. Hinzugabe von 0,2 ml Chloroform und Inkubation für 3 min bei 15-30 °C,

3. Zentrifugation bei 4 °C und 10000 rpm für 14 min,
4. Abnahme des Überstandes (RNA in wässriger Phase) und Mischen mit 500 µl Isopropanol, Inkubation für 10 min,
5. Zentrifugation bei 4 °C und 10000 rpm für 40 min, Waschen mit 70 % Ethanol (DEPC- Wasser) und nochmals zentrifugieren für 40 min,
6. Abnahme der Ethanolreste und Lösung des Pellets in 30 µl RNase-freiem Wasser.

Probenvermessung:

1. Verdünnung der RNA mit RNase-freiem Wasser 1:25,
2. Bestimmung der Absorptionen im Spektralphotometer bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm,
3. Berechnung des Probenvolumens für 200 ng RNA.

Im nächsten Schritt erfolgte die Transkription der mRNA in die cDNA. Eine DNase-Zugabe bewirkte, dass eventuell bei der Trizol-Isolierung übertragene DNA-Anteile aus den Proben eliminiert wurden. Im Anschluss erfolgte die Denaturierung der RNA unter Zugabe von Hexameren. Diese bestehen aus einer Abfolge von 6 zufällig aufeinander folgenden Basenpaaren und fungieren als unspezifische Primer. Die Hexamere lagern sich vielerorts an die RNA an. Infolgedessen wird eine vollständige Transkription der RNA in cDNA gewährleistet.
Zur Vermeidung akzidentieller Verdauung der RNA wurde bei dem Transkriptions-vorgang ein RNase-Inhibitor zugesetzt.

1. Verdünnung von 200 ng RNA auf ein Gesamtvolumen von 9µl mit RNase-freiem Wasser,
2. Versetzen der Proben mit DNase (0,5 µl) und Inkubation im Thermocycler für 15 min bei 37 °C, anschließend Inkubation für 5 min bei 75 °C. Abkühlen der Proben auf 4 °C,
3. Zugabe der Hexamere (2 µl) und erneute Inkubation für 10 min bei 70 °C, anschließend für 5 min auf Eis.
4. Versetzen der Proben mit dem RT-Mix und Starten des Transkriptionsvorganges im Thermocycler (5 min bei 25 °C, 60 min bei 37 °C).

RT-Mix:	je Ansatz	5x Puffer (5 nmol $MgCl_2$)	4 µl	
		DTT 100 mM	2 µl	
		dNTPs 10 mM	1,0 µl	
		Protector RNase Inhibitor	0,5 µl	
		MMLV Invitrogen (200 U/µl)	1,0 µl	insg. 20 µl/Ansatz

Zur Vorbereitung der RT-PCR wurden die Proben noch einmal mit RNase-freiem Wasser verdünnt. Anschließend wurden sie mit Primern, Sonden und einem einheitlichen Master-Mix versetzt.

Als Referenzgen wurde humanes ß-Actin eingesetzt. Die Expression von Referenzgenen sollte in allen Versuchen und Kontrollen konstant bleiben.
Es wurden alle Proben jeweils in Doppelbestimmung angesetzt.

Master-Mix:	dNTPs
	Taq-Polymerase
	5x Puffer (5 nmol $MgCl_2$)

weiterhin spezifisch für ß-Actin hum. / S100A8 hum. / S100A9 hum. / ICAM-1 / RAGE:

	Forward-Primer
	Reverse-Primer
	Gensonden 5 nmol

Der eigentliche RT-PCR-Vorgang fand im Taqman 7300 der Fa. Applied Biosystems nach Ansatz aller Proben auf 96er Kavitäten-Platten statt und umfasste 40 Zyklen.

Auswertung

Die Auswertung erfolgte mittels der dd-CT-Methode. Dabei wurde zunächst ein Abgleich der CT-Werte gegen die CT-Werte des Referenzgens durchgeführt (z.B. $dCT=\Delta CT=CT_{S100A8}-CT_{ß\text{-}Actin}$). Anschließend wurden die ddCT-Werte durch Subtraktion der dCT-Werte der Lösungsmittelkontrolle ermittelt (z.B. $ddCT_{48hIL6}=dCT_{48hIL6}-dCT_{48hLsgmk}$). Die Berechnung der 2^{-ddCT}-Werte ermöglichte dann eine relative Quantifizierung der Werte. Anschließend konnten die Ergebnisse im Vergleich graphisch dargestellt werden.

2.4 ELISA

Das Prinzip der Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)-Proteinbestimmung beruht auf gekoppelten Antikörper-reaktionen. Eine Mikrotiterplatte ist mit einem sogenannten coating-Antikörper beschichtet, an diesen bindet in diesem Fall das S100A8/A9-Heterodimer. Anschließend binden nacheinander zwei weitere Antikörper, wobei der Zweitantikörper wiederum mit einer Peroxidase gekoppelt ist. Diese katalysiert letztlich die Färbung des Substrates, hier TMB und ermöglicht über die Messung der Absorption im ELISA-Reader eine quantitative Konzentrationsbestimmung. Die Bestimmung von S100A8/A9 in den Überständen erfolgte mittels kommerzieller Human Calprotectin ELISA Kits der Fa. Cellsciences. Diese erlauben einen hochsensitiven Nachweis der S100A8/A9-Proteine. Die bei -80 °C tiefgefrorenen Überstände wurden aufgetaut und nach folgendem Protokoll bestimmt.

1. Vorbereitung von Wasch-, Verdünnungspuffer, Tracer und Peroxidase-Konjugat nach Herstellerprotokoll,
2. Pipettieren der Standardreihe, je 100 µl als Doppelwerte,
3. Pipettieren der unverdünnten Proben, je 100 µl als Doppelwerte,
4. Abdecken der Mikrotiterplatte und Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur,
5. Waschen, 4 mal mit je 200 µl Waschpuffer,
6. Zugabe von je 100 µl Tracer,
7. 1 h Inkubation bei Raumtemperatur, anschließend Waschvorgang,
8. Zugabe von je 100 µl Peroxidase-Konjugat ,
9. 1 h Inkubation bei Raumtemperatur, anschließend Waschvorgang,
10. Zugabe von je 100 µl TMB-Substrat,
11. Inkubation für 20-30 min unter Schutz vor Lichteinwirkung,
12. Zugabe von je 100 µl Stop-Lösung,
13. Auswertung der Platte im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm.

2.5 PAGE und Western Blot

2.5.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung

Zur Sicherstellung gleicher Proteinmengen bei der Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) wurde vorab eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt. Die Messung erfolgte mittels des BCA Protein Assays der Fa. Pierce. Die Proben wurden jeweils so

verdünnt, dass die Proteinkonzentrationen im linearen Messbereich des Assays zwischen 20 und 2000 µg/ml lagen. Als Standardprotein wurde der BSA-Standard der Fa. Pierce (Smith et al., 1985) eingesetzt.

Reagenzien und Ansatzprotokoll

- Pipettieren von je 25 µl Probe bzw. Standard in ein Eppendorfgefäß,
- Hinzupipettieren von 200 µl Arbeitslösung,
  Arbeitslösung: Reagenz A und B im Verhältnis 50:1,
  Reagenz A Natriumkarbonat, Natriumbikarbonat, Bicinchoninsäure, Natriumtartrat in 0,1 M Natriumhydroxid,
  Reagenz B 4 %-iges Kupfersulfat,
- Schütteln für 30 sec,
- Inkubation für 30 min bei 37 °C,
- Abkühlen der Platte auf Raumtemperatur, Extinktionsbestimmung bei 570 nm.

2.5.2 Aufarbeitung von Zytoplasma für Proteinfraktionen

Zur Zelllyse und Gewinnung der Proteinfraktionen für den RAGE-Blot wurden die Zellen für 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert, in PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden sie mit 100 µl des Lysepuffers versetzt. Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte die erneute Zentrifugation bei 15000 rpm. Die Membranfraktion, welche für die RAGE-Bestimmung im Western Blot benötigt wird, stellt sich nun als Sediment dar. Zytoplasmafragmente befinden sich dagegen im Überstand. Anschließend wurde 1:1 Sample Buffer hinzugefügt. Es erfolgte eine Erhitzung der Proben für 5 min bei 95 °C.

Lysepuffer: 50 mM Tris-Cl pH 7,4
150 mM KCl
5 mM Gluc
0,5 mM EDTA
2 mM DTT
1 % Triton x-100 / ad 10 ml 1 Tablette Protease inhibitor cocktail

2.5.3 PAGE

Bei der PAGE werden Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe, Ladung und Beschaffenheit des Trennmediums gegeneinander aufgetrennt. Sodium dodecylsulfate (SDS) überlagert die Eigenladung der Proteine und die Auftrennung erfolgt nur noch anhand ihrer Größe und des Molekulargewichtes. Anschließend können sie angefärbt und beispielsweise im Western Blot dargestellt werden. Zur Auftrennung der Proteine wurde ein 10-20 %-iges Gradientengel und ein 5 %-iges Sammelgel der Fa. Invitrogen/ Novex benutzt. Pro Geltasche wurde 30 µg Gesamtprotein aufgetragen. Als Positivkontrolle für den RAGE-Blot diente Lungen-Aceton-Puder.

Elektrophoresepuffer:	Tris base	30 g
	Glycin	144 g
	10 %-iges SDS	100 ml / ad 1000 ml ddH_2O.

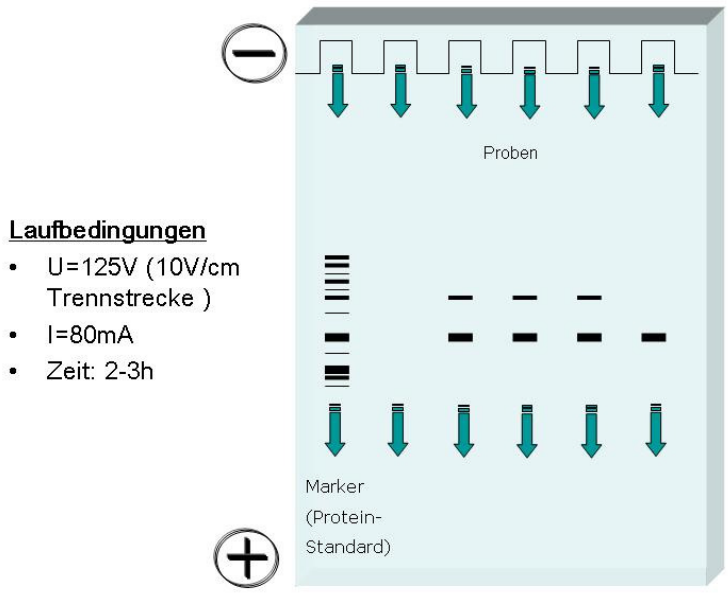


Abbildung 2-1: Polyacrylamidgelelektrophorese

2.5.4 Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Mittels Silberfärbung ist es möglich, Proteine in Polyacrylamidgelen anzufärben. Bei niedrigen Proteinkonzentrationen erzielt man hierbei die beste Sensitivität (Oakley et al., 1980). Alle Lösungen sollten unmittelbar vor der Färbung angesetzt werden.

Reagenzien und Lösungen

Fixierlösung:	30 % Ethanol	600 ml	
	10 % Essigsäure	200 ml	/ddH_2O ad 2 l,
Sensitivierlösung:	30 % Ethanol	75 ml	
	0,5 M Natriumacetat	10,25 g	
	0,5 % Glutaraldehyd	1,25 ml	
	0,2 % Natriumthiosulfat	0,5 g	/ddH_2O ad 250 ml,
Silbernitratlösung:	0,2 M AgNO3	10 ml (2,5 M Stock)	
	0,02 % Formaldehyd 37 %	50 µl	/ddH_2O ad 125 ml,
Entwicklerlösung:	3 % Na2CO3	7,5 g	
	0,01 % Formaldehyd 37%	50 µl	/ddH_2O ad 250 ml,
Stopplösung:	0,05 M EDTA	4,65 g	/ddH_2O ad 250 ml,
Konservierlösung:	30 % Ethanol	75 ml	
	5 % Glycerin	12,5 ml	/ddH_2O ad 250 ml.

Färbeprotokoll

- 30 min Silber-Fixierer,
- kurze Spülung mit ddH_2O,
- 30 min Sensitivierlösung,
- Waschen 3x10 min mit ddH_2O,
- 20 min 0,2 % $AgNO_3$,
- Entwickler 2-10 min,
- Stopplösung mindestens 30 min,
- 2x30 min Konservierlösung.

2.5.5 Western Blot

Beim Western Blot werden Proteine nach der elektrophoretischen Auftrennung auf eine Trägermembran, hier aus Polyvinyldifluorid (PVDF), übertragen. Die Wanderung der Proteine wird dabei durch ein senkrecht zum Polyacrylamidgel gerichtetes elektrisches Feld induziert. Aufgrund hydrophober Wechselwirkungen bleiben die Proteine nach dem Blot an der Trägermembran haften und können anschließend zum Beispiel durch Antikörperfärbungen sensitiv dargestellt werden.

Verwendet wurde eine Tankblot-Apparatur der Fa. Invitrogen/Novex. Die PVDF Membran wurde vor dem Transfer für eine Minute mit Methanol benetzt und anschließend im Transferpuffer äquilibriert. Ebenso wurde auch das 3MM Whatman Papier mit Transferpuffer getränkt.

Laufbedingungen

- U=50V
- I=300mA
- Zeit: 2h

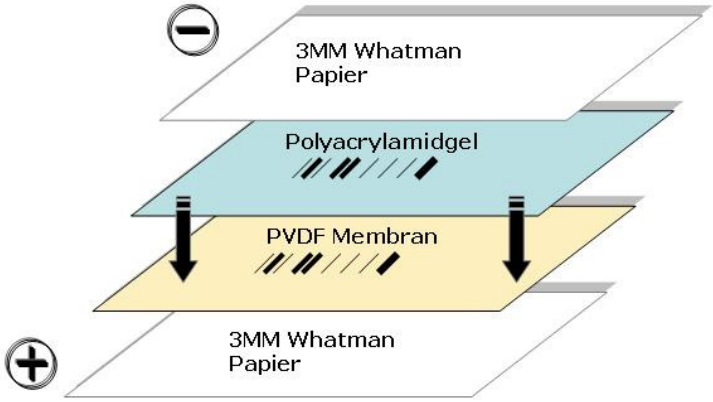


Abbildung 2-2:
Blot der Proteine vom Polyacrylamidgel auf die PVDF Membran

Lösungen und Puffer

Transferpuffer:	Glycin	5,8 g
	Tris base	11,6 g
	10%-iges SDS	7,4 ml
	20% Methanol	400 ml / ad 2000 ml ddH_2O,
0,05 % PBS Tween:	Tween	0,5 ml
	1x PBS	1000 ml,
Blockierpuffer:	Roti-Block (Fa. Roth)	1:10 ad ddH_2O.

2.5.6 Unspezifische Proteinfärbung mit Ponceau S

Für eine schnelle Beurteilung des Transfererfolges der Proteine bietet es sich an, eine unspezifische Färbung der PVDF Blotmembranen mit Ponceau S vorzunehmen. Ponceau S ist aufgrund der schnellen und reversiblen Anfärbung gut für diese Zwecke geeignet.

Reagenzien und Lösungen

Färbereagenz: 2 % Ponceau S Konzentrat (30 % Trichloressigsäure, 30 % Sulfosalicylsäure),

Färbelösung: 10 % Ponceau S Färbereagenz ad ddH_2O.

Färbeprotokoll

- Inkubation der Membranen nach dem Blotverfahren für etwa 5 min in der Ponceaufärbelösung,
- Abstoppen der Färbung bei Erscheinen einzelner Proteinbanden,
- Entfärbung der Membran mittels dreimaligem Spülen in 0,5 % PBS/Tween für je 5 min.

2.5.7 Antikörperfärbung von Proteinen auf Blotmembranen

Proteine lassen sich über gekoppelte Antikörperreaktionen sensitiv darstellen. An den primären Protein-Antikörper-Komplex bindet zunächst ein zweiter, horseradish peroxidase (HRP)-gekoppelter Antikörper. Die über die HRP katalysierte Reaktion zur Erzeugung eines chemiluszenten Farbstoffes ermöglicht schließlich die Detektion durch Autoradiographiefilmbelichtung. Das hier verwendete ECL plus System der Fa. Amersham erreicht eine bis zu 20-fach erhöhte Sensitivität gegenüber früheren Verfahren mit z.B. Chlornaphthol. Zur Darstellung kamen Autoradiographiefilme der Fa. Amersham zum Einsatz.

Entwicklungsprotokoll

- Inkubation für 2 h in Rotiblock-Lösung bei Raumtemperatur,
- Waschen der Membran mit 0,05 % PBS Tween,

- Inkubation mit dem Erstantikörper in Blockierpuffer über Nacht (anti-RAGE, Fa. Chemicon MAB5328, 1:2000),
- Waschen mit PBS Tween 3x10 min,
- Inkubation mit dem Zweitantikörper in Blockierpuffer für 1 h (Goat anti-Mouse HRP-Conjugated, Fa. Pierce 1858413, 1:10.000),
- Waschen mit PBS Tween 3x10 min,
- Inkubation in Substratlösung für 5 min,
  Substratlösung: ECL plus Detection Kit,
  Reagenz A und Reagenz B 40:1,
- Abstreifen der Substratlösung und Belichtung eines Autoradiographiefilms (Expositionszeit 1–30 min).

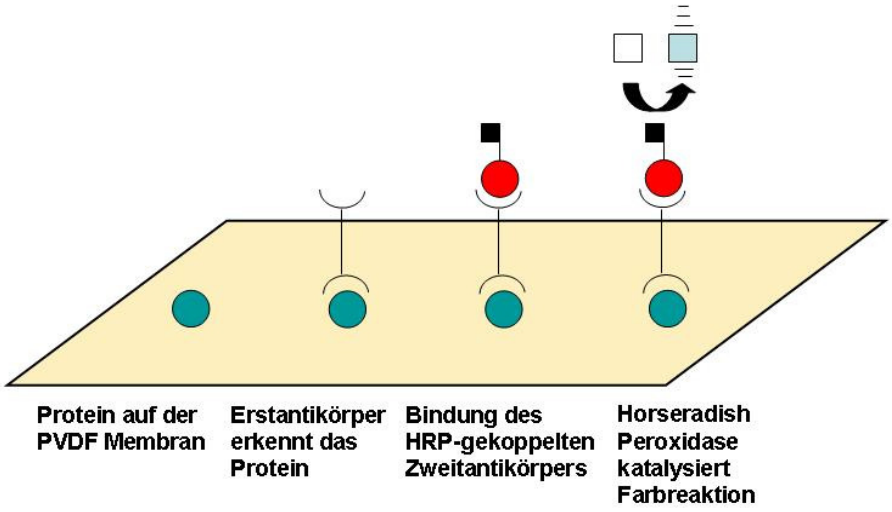


Abbildung 2-3:

Prinzip der sensitiven Darstellung von Proteinen über gekoppelte Antikörperreaktion

2.6 Fotodokumentation

Die Morphologie der Zellen wurde nach den Stimulationsversuchen fotografisch dokumentiert. Hierbei kam eine an das Zellkultur-Mikroskop montierte Digitalkamera zum Einsatz (Fa. Kodak).

2.7 Statistische Auswertung

Bei der statistischen Auswertung wurde mit dem Programm SigmaPlot gearbeitet. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des ungepaarten T-Tests auf Signifikanz überprüft. Dabei wurde ein $p\text{-Wert}<0{,}05$ als signifikant gewertet. In den Graphiken wurden die entsprechenden Mittelwerte und der Standardfehler dargestellt.

2.8 Geräte, Materialien und Reagenzien

Geräte

Abzug, Thurm Labortechnik
Biosafe Eco CO2-Inkubator, Integra Biosciences
Digitalkamera, Kodak EasyShare
ELISA Reader antho hT III, Anthos Labtec
Eppendorf coll centrifuge 5417R
HeraSafe Sicherheitswerkbank, Heraeus Instruments
High Voltage Power Pack P30, Biometra, 258087
Kreisschüttler MTS 2/4 digital IKA, Roth Laborbedarf
Mikroskop für Zellkultur, Leica
Millipore Water Purification System
Neubauer-Zählkammer
Nunc Immuno Wash 12 Waschbank, Nunc Brand Products
Personal Cycler, Biometra
Spektralphotometer DU 640, Beckmann
Taqman 7300, Applied Biosystems
Thermocycler Uno II, Biometra
Tiefkühltruhe -80 °C MDF-593, Sanyo
Tischzentrifuge mini Spin, Eppendorf AG
Vortex MS1 Minishaker IKA, Roth Laborbedarf
Wasserbad 37 °C, GFL
X Cell Sure Lock Gel- und Blotkammer, Novex: mini-Cell, Invitrogen
Zentrifuge Megafuge 1.0 R, Heraeus Sepatech
Zentrifuge Sigma 4K10

Materialien

10 ml Einwegspritze mit Luer-Lock Ansatz, Braun
10-20 % Tricine Gel 1.0 mmx12 well, Invitrogen Cat No. EC66252BOX
16 % Tricine Gel 1.0 mmx12 well, Invitrogen Cat No. EC66952BOX
6-Well-Platten Falcon, Becton Dickinson Labware 353046
Combitips plus 5 ml, Eppendorf AG
Eppendorf research Pipetten 0,5-10 µl, Eppendorf AG

Eppendorf research Pipetten 100-1000 µl, Eppendorf AG
Eppendorf research Pipetten 20-200 µl, Eppendorf AG
Eppendorf research Pipetten 2-20 µl, Eppendorf AG
Eppendorf research Pipetten 500-5000 µl, Eppendorf AG
Eppendorf Tubes Sure Lock 500 µl, 1500 µl, 2000 µl
Falcon Tubes 10 ml, Becton Dickinson Labware 352097
Falcon Tubes 50 ml, Becton Dickinson Labware 352070
Gewebekulturschalen Falcon, Becton Dickinson Labware 353004
Multipipette Eppendorf research pro 5-100 µl
Optical Caps für Optical Tubes, Applied Biosystems
Optical Tubes MicroAmp 0,2 ml, Applied Biosystems
Pipettenspitzen Eppendorf 0,5-20 µl, 10-200 µl, 100-1000 µl, Eppendorf AG
Pipettenspitzen Eppendorf 100-1000 µl, Sarstedt AG 70.762
PS Microplatte 96 well, Greiner Labortechnik
Serologische Pipetten Falcon 10 ml, Becton Dickinson Labware 357551
Serologische Pipetten Falcon 25 ml, Becton Dickinson Labware 357525
Serologische Pipetten Falcon 5 ml, Becton Dickinson Labware 357543
Sterican Luer-Lock Kanüle lang
Sterile Filtereinheit 0,2 µm, Schleicher & Schuell MicroScience 10462200
Zellkulturflaschen Falcon, Becton Dickinson Labware 353014/353108

Reagenzien und Laborbedarf

Antikörper

Mouse anti-RAGE Monoclonal Antibody, Chemicon International, MAB5328
Mouse anti-human S100A8/A9, Monoclonale Antibody, Cell Sciences, HM2156
Zweitantikörper: Stabilized Goat anti-Mouse, HRP-Conjugated, Pierce 1858413
Mouse Isotype Control IgG1k, Sigma 4685

3mm Whatman Papier
AGE (siehe Methoden 2.1.3.)
Albumin Standard, Pierce 23209
Aqua ad iniectabilia, Braun
Autoradiographiefilme (Fa. Amersham Biosciences)

BCA Protein Assay Reagent Kit, Pierce, 23225
BCT Clotting Assay, Dade Behring
BSA Albumin, bovine serum, Protease-frei / SAFC
D(+)-Gluc, Merck KG
DNase I 2 U/µl, Ambion
ECL plus Western Blotting detection system, Amersham Biosciences, RPN2132
Erythrosin B-Lösung, ATCC
Fetal Bovine Serum (FBS), zertifiziert / Endotoxin-getestet / hitzeinaktiviert, Biochrom
Gensonden, Eurogentec
Hexamere, TIB Molbiol
Human Calprotectin ELISA kit, Hycult Biotechnology HK325
IL-6 human, Sigma Aldrich I1395-10UG 046K1155
PBS 1x, GIBCO 14190
PenStrep (Penicillin 10000 U/ml / Streptomycin 10000 µg/ml), Biochrom
PVDF Membran, Millipore
Rotiblock Blockierpuffer, Roth
RPMI 1640, GIBCO 21875
RT-Mix, Invitrogen / dNTPS Amersham Biosciences
TaqMan Universal PCR MasterMix, Applied Biosystems
THP-1 (human), ATCC No. TIB-202
TNFα human, BD Biosciences 554618, Lot 33302 10 µg in 50 µl

Alle weiteren Labordiagnostika und Chemikalien wurden, soweit nicht gesondert vermerkt, über die Firmen Sigma Aldrich, Roth und Merck bezogen.

3 Ergebnisse

Die humanen THP-1 Zellen der Fa. ATCC, die einer leukämischen Zelllinie mit ausgeprägten Monozyten-Markern entstammen, wurden unter den beschriebenen Zellkulturbedingungen stimuliert. Dabei wurden nur Zellen eingesetzt, die nicht länger als 9 Passagen in Kultur standen. Neue Versuche wurden stets erst nach einer Woche und so mit einer neuen Passage begonnen. Die Zellen wurden zum Beginn und Ende der Versuche unter dem Mikroskop inspiziert und zeigten, soweit nicht gesondert vermerkt, keine morphologischen Auffälligkeiten.

3.1 Stimulation mit IL-6 und TNFα

Die Initialversuche mit den Zytokinen IL-6 und TNFα dienten der Zeit- und Dosisfindung. Hierfür wurden die Zeitpunkte 4 h, 8 h, 12 h, 24 h und 48 h gewählt. Die Inkubationen wurden mit IL-6-Konzentrationen von 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml durchgeführt, um eine mögliche Dosisabhängigkeit aufzuzeigen. Bei TNFα wurde mit einer Konzentration von 10 ng/ml stimuliert.

Die Berechnung der mRNA-Expressionsraten erfolgte mit Hilfe der dd-CT-Methode. Hierbei werden für jeden Zeitpunkt jeweils die Lösungsmittelkontrollwerte (BSA-Kontrollen) von den Werten der Stimulationsgruppe subtrahiert (z.B. $ddCT_{48hIL6}=dCT_{48hIL6}-dCT_{48hLsgmk}$). Die Berechnung der Expressionsraten für die Lösungsmittelkontrolle erfolgt analog ($ddCT_{48hLsgmk}=dCT_{48hLsgmk}-dCT_{48hLsgmk.}=0$). Werden die ddCT-Werte nun in die Formel 2^{-ddCT} eingesetzt, erhält man die relativen Expressionsraten. Daher ergibt sich zu jedem Zeitpunkt eine relative Expressionsrate der Lösungsmittelkontrolle von 1 ($2^0=1$). Der Zeitverlauf der S100A8/A9-Expression in den Kontrollen ist somit nicht mehr nachzuvollziehen und wurde deshalb gesondert dargestellt. Hier wurde auf eine Berechnung mit Hilfe der dd-CT-Methode verzichtet und die CT-Werte (Schwellenwert-Zykluszahlen) wurden direkt abgebildet. Es zeigte sich keine Veränderung der mRNA-Expression über den gewählten Zeitraum (Abb. 3-1). In allen folgenden Abbildungen wurden die BSA-Kontrollwerte daher wie beschrieben „1“ gesetzt.

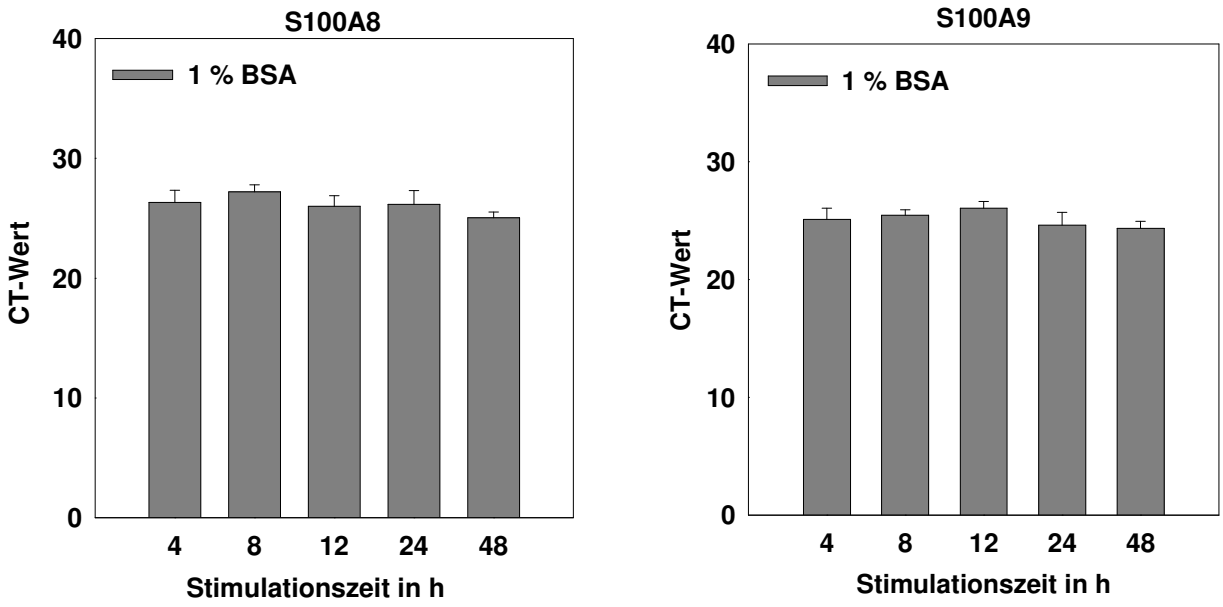


Abbildung 3-1: S100A8/S100A9-mRNA-Expression der THP-Zellen unter Kontrolle mit 1 % BSA (n=5)
Dargestellt sind jeweils die CT-Werte. Es ergab sich keine signifikante Zu- oder Abnahme der S100A8/S100A9-Expression. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte (mean) und der Standardfehler (SEM).

Bei Stimulation der THP-Zellen mit IL-6 und TNFα zeigte die Quantifizierung der mRNA von S100A8 und S100A9 dagegen eine zeitabhängige Zunahme der S100A8/S100A9-Expression (Abb. 3-2 und Abb. 3-3).

Die IL-6-Stimulation führte bereits nach 4 h zu einer signifikanten Steigerung der S100A8/A9-mRNA-Synthese. Bis zur 48-stündigen Inkubation mit IL-6 wurde eine stetige Steigerung beobachtet, jedoch kein Maximum der Expression erreicht. Die größte Steigerung mit einer etwa 10-fach höheren relativen Expressionsrate zeigte sich bei 48-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml IL-6 für die S100A9-Expression. Eine Dosisabhängigkeit konnte insgesamt für die IL-6-Inkubation nicht festgestellt werden (Abb. 3-2). Der Anstieg der mRNA-Expression unter TNFα-Einfluss zeigte dagegen für S100A8 erst ab 12 h, für S100A9 ab 8 h eine signifikante Erhöhung und wies sein Maximum bei 24 h auf. Anschließend erfolgte bereits ein Abfall der S100A8-Expression, beziehungsweise eine Stagnation bei etwa 4,5-fach erhöhter Expressionrate für S100A9 (Abb. 3-3).

Die Analyse der Überstände im ELISA zeigte für die IL-6-Stimulation signifikant erhöhte S100A8/A9-Konzentrationen nach 48 h Versuch (Abb. 3-4). Bei der Stimulation mit TNFα waren dagegen schon nach 24 h signifikant gesteigerte Konzentrationen des S100A8/A9-Heterodimers im Überstand nachweisbar (Abb. 3-5).

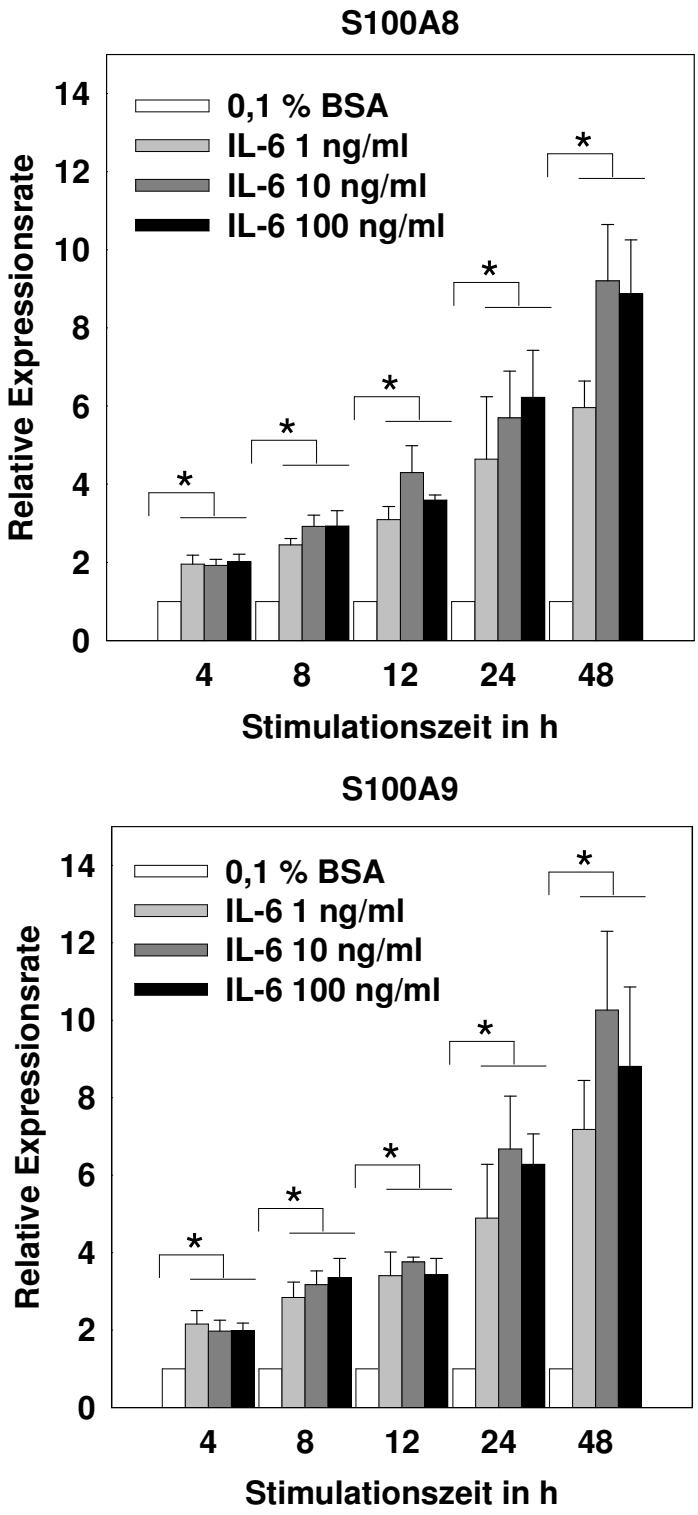


Abbildung 3-2: Expression der S100A8- und S100A9-mRNA nach IL-6-Stimulation (n=5)

Die Stimulation mit IL-6 führte bereits nach 4 h zu einer signifikanten Steigerung der Expression von S100A8 und S100A9 in den THP-1 Zellen. Die Unterschiede zwischen den drei Stimulationsgruppen mit unterschiedlicher IL-6-Konzentration waren nicht signifikant. Für die weiteren Versuche wurde daher nur die Stimulation mit 10 ng/ml IL-6 gewählt. Dargestellt sind mean und SEM, * $p<0,05$ im Vergleich zur Kontrolle (0,1 % BSA).

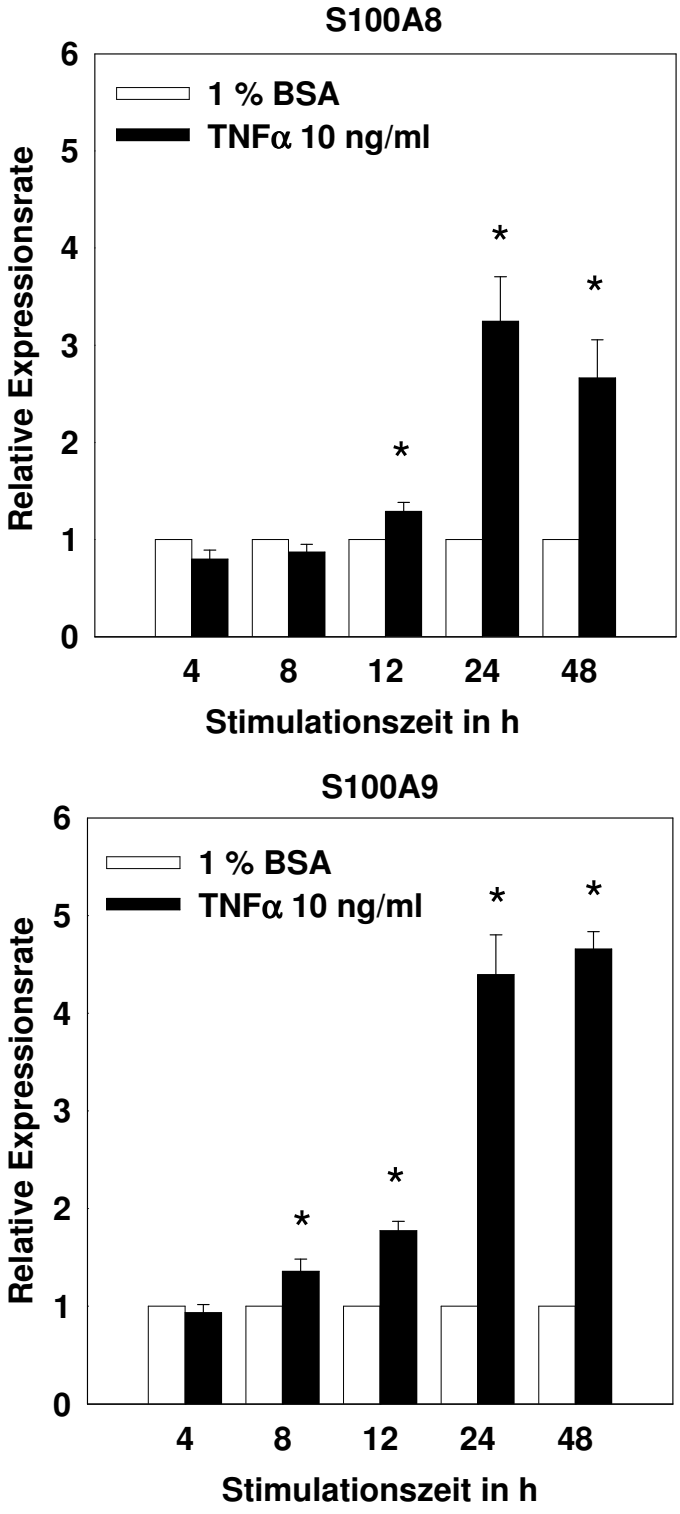


Abbildung 3-3: Expression der S100A8- und S100A9-mRNA nach TNFα-Stimulation (n=5)

Nach 12 h TNFα-Stimulation konnte eine signifikante Erhöhung der S100A8-Expression beobachtet werden. Die stärkste Zunahme der Expression fand zwischen 12 h und 24 h Inkubation statt. Zwischen den Gruppen mit 24 h und 48 h Stimulation ergab sich kein signifikanter Unterschied mehr. Bei S100A9 zeigte sich bereits nach 8 h eine signifikante Erhöhung der mRNA-Synthese. Auch hier fand sich aber kein signifikanter Unterschied mehr zwischen 24 h und 48 h TNFα-Inkubation. Dargestellt sind mean und SEM, * $p<0,05$ im Vergleich zur Kontrolle (1 % BSA).

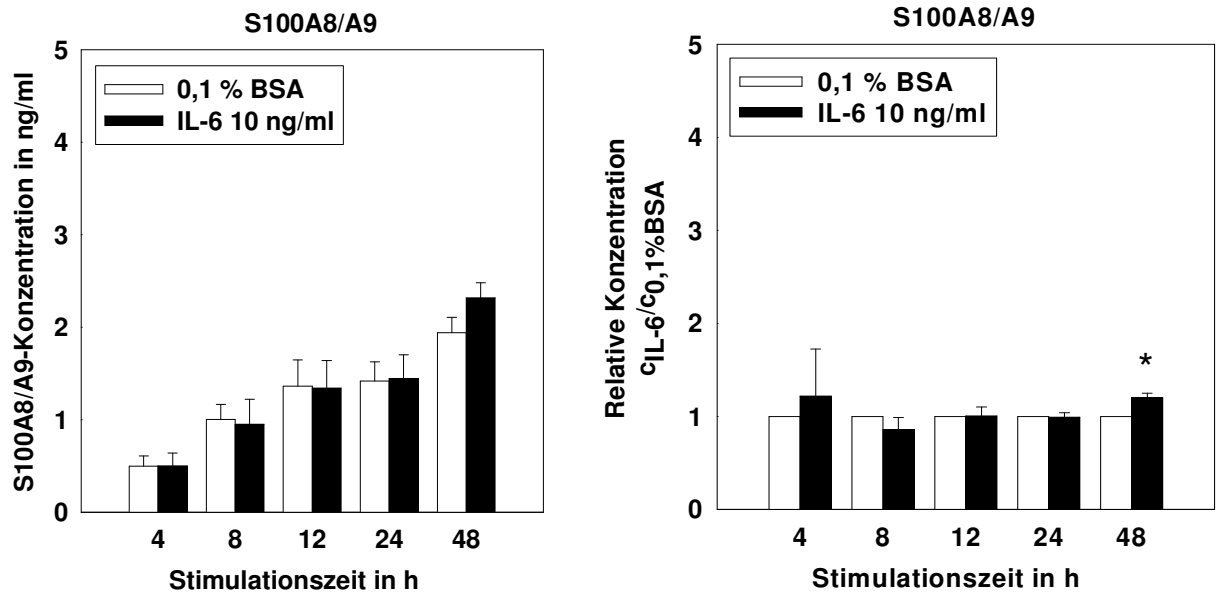


Abbildung 3-4: S100A8/A9 im Überstand nach IL-6-Stimulation (n=5)

Das Heterodimer aus S100A8 und S100A9 war im Überstand zeitabhängig in steigender Konzentration nachweisbar (links). Da diese Zunahme auch in der Kontrollgruppe stattfand, wurden die Konzentrationen der Stimulations- und Kontrollgruppe anschließend zueinander ins Verhältnis gesetzt (rechts). Es wurden nur in der relativen Darstellungsweise und erst nach 48 h signifikante Unterschiede zwischen der Stimulations- und der Kontrollgruppe erkennbar. Dargestellt sind mean und SEM, *p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle (0,1 % BSA).

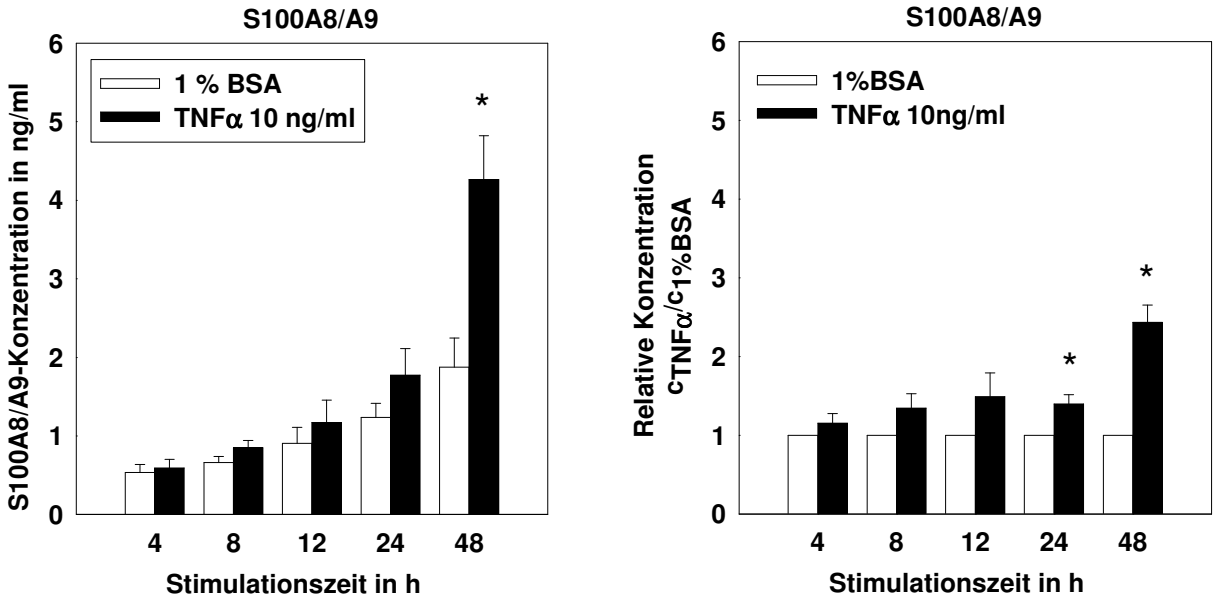


Abbildung 3-5: S100A8/A9 im Überstand nach TNFα-Stimulation (n=5)

Entsprechend Abbildung 3-4 wurden auch hier links die absoluten S100A8/A9-Konzentrationen im Überstand dargestellt und rechts das Verhältnis der Konzentrationen von Stimulations- zu Kontrollgruppe. Im Gegensatz zu den Beobachtungen bei IL-6, war für TNFα bereits nach 24 h Stimulationszeit eine signifikant erhöhte relative Konzentration des S100A8/S100A9-Heterodimers festzustellen. In der absoluten Darstellungsweise war die Erhöhung erst nach 48 h signifikant. Dargestellt sind mean und SEM, *p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle (1 % BSA).

3.2 Stimulation mit AGE

Die Inkubation der THP-1 Zellen mit AGE wurde analog zur Stimulation mit IL-6/TNFα durchgeführt. Stimuliert wurde in vier Einzelversuchen mit AGE-Konzentrationen von 1000 ng/ml (n=2), 2000 ng/ml und 4000 ng/ml. Es wurden die Zeitpunkte 4 h, 12 h und 48 h gewählt. In diesen Vorversuchen zeigte die Quantifizierung der mRNA keine signifikanten Veränderungen der S100A8-und S100A9-Expression nach AGE-Zugabe (Abb. nicht gezeigt).

3.3 Stimulation mit IL-6 und TNFα nach AGE-Vorinkubation

Die Wirkung von AGE auf die THP-Zellen wurde anschließend näher untersucht durch eine Kombination aus AGE-Vorinkubation und anschließender Zytokinstimulation. Dabei wurde zunächst eine 24-stündige Vorinkubation der THP-1 Zellen mit AGE vorgenommen, anschließend erfolgte ohne Mediumwechsel die Stimulation mit IL-6 und TNFα für 48 h. Zeigten die Zellen unter AGE allein noch keine verstärkte S100A8/A9-Expression, kam es nun zu einer Vervielfachung der mRNA-Synthese im Vergleich zur alleinigen IL-6/TNFα–Inkubation (Abb. 3-6).

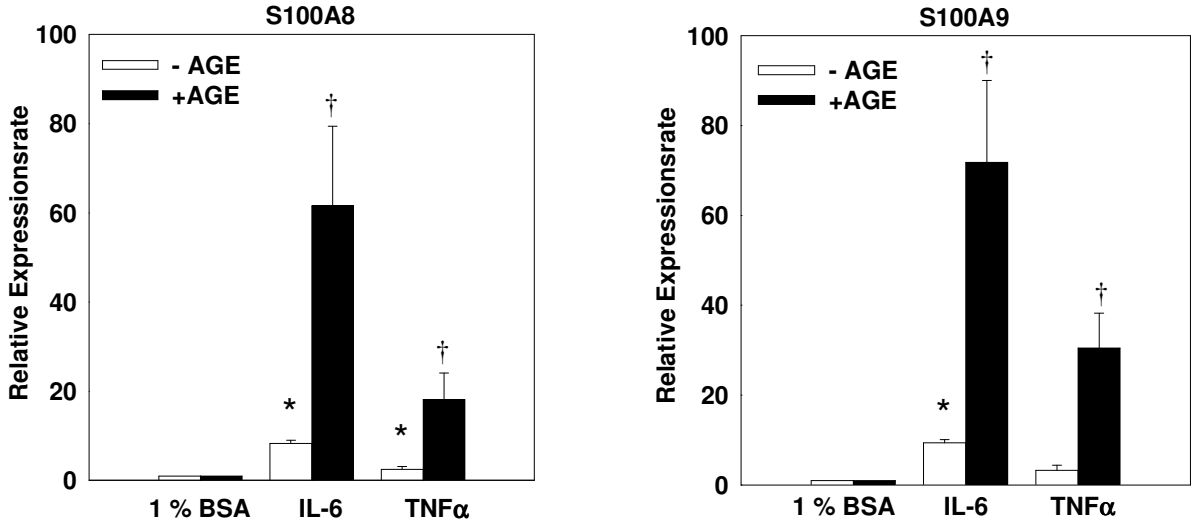


Abbildung 3-6: S100A8/A9-mRNA-Expression nach 2000 ng/ml AGE-Vorstimulation für 24 h und Stimulation mit 10 ng/ml IL-6/TNFα für 48 h (n=5)

Es bestätigte sich die bereits gezeigte Zunahme der S100A8 und S100A9-Expression nach 48 h IL-6 Stimulation. Diese fiel für beide Proteine signifikant aus. Unter TNFα-Inkubation fand ebenfalls eine Erhöhung statt, die jedoch nur für S100A8 signifikant war. Die mit AGE vorbehandelten und anschließend mit IL-6/TNFα stimulierten Zellen wiesen eine signifikant höhere S100A8/S100A9-Expression auf als die nicht mit AGE vorinkubierten THP-1 Zellen. Dargestellt sind mean und SEM; * $p<0,05$ Stimulation ohne AGE vs. BSA-Kontrolle ohne AGE;
† $p<0,05$ Stimulation mit AGE vs. Stimulation ohne AGE.

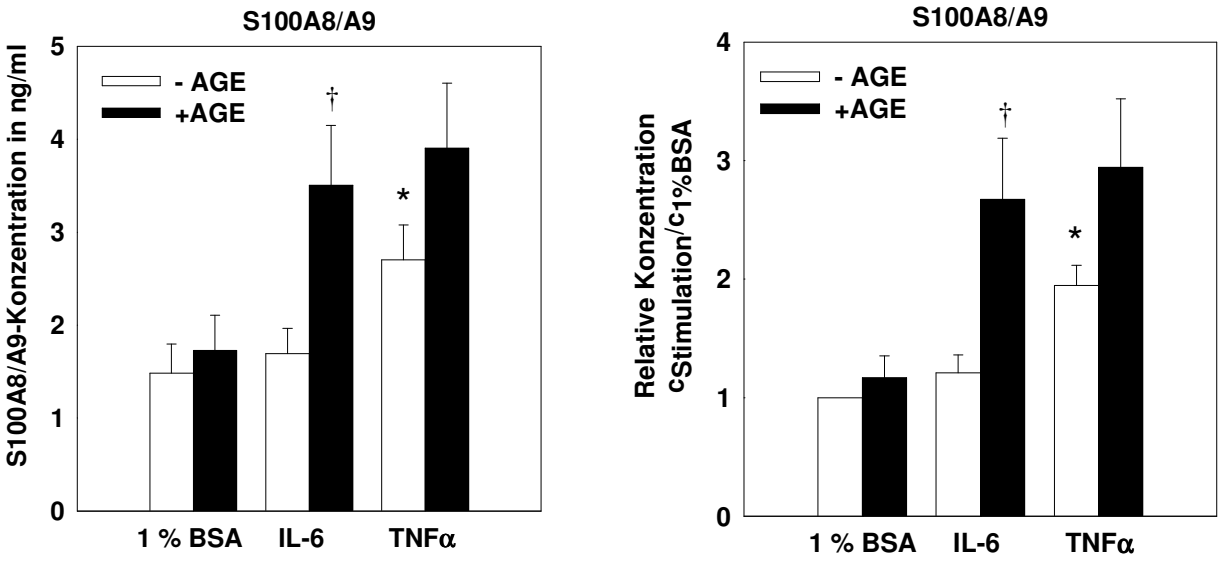


Abbildung 3-7: S100A8/A9 im Überstand nach 2000 ng/ml AGE-Vorstimulation für 24 h und Stimulation mit 10 ng/ml IL-6/TNFα für 48 h (n=5)

Auch hier sind die im ELISA gemessenen Konzentrationen absolut (links) und relativ (rechts) dargestellt. Da jedoch keine Zeitkinetik mehr vorliegt unterscheiden sich die Darstellungen kaum. Daher werden in späteren Versuchen nur noch die relativen Konzentrationen dargestellt. Es bestätigte sich die bereits in Abbildung 3-5 dargestellte Erhöhung von S100A8/A9 nach 48 h TNFα-Stimulation. Deutlicher fiel die S100A8/A9-Akkumulation im Überstand nun aber für die mit AGE vorbehandelten Zellen aus. Für IL-6 war die Erhöhung im Vergleich zur nicht mit AGE vorinkubierten Gruppe signifikant, für TNFα jedoch nicht. Dargestellt sind mean und SEM; * $p<0,05$ Stimulation ohne AGE vs. BSA-Kontrolle ohne AGE; † $p<0,05$ Stimulation mit AGE vs. Stimulation ohne AGE.

Neben S100A8/S100A9 wurde in diesem Versuch auch das Verhalten des Rezeptors für AGE (RAGE) untersucht. Die Expression der RAGE-mRNA zeigte sich bei den mit AGE vorbehandelten THP-Zellen nicht signifikant erhöht im Vergleich zu den AGE-unbehandelten Zellen (Abb. 3-8).

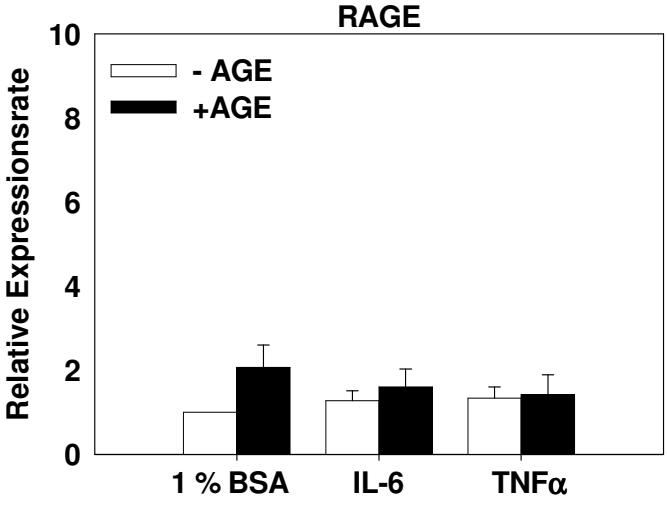


Abbildung 3-8: Expression der RAGE-mRNA nach 2000 ng/ml AGE-Vorinkubation für 24 h und Stimulation mit 10 ng/ml IL-6/TNFα für 48 h (n=5)

Es ergaben sich keine signifikanten Veränderungen zwischen den einzelnen Kontroll- und Stimulationsgruppen. Auch die erhöhte RAGE-Expression in der Kontrollgruppe mit AGE im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne AGE war nicht signifikant. Dargestellt sind mean und SEM.

Anschließend erfolgte die Untersuchung der Membranfragmente der THP-Zellen im Western Blot. Dieser präsentierte eine vermehrte Existenz des Rezeptors auf der THP-1-Zellmembran (Abb. 3-9). Dies spricht im Gegensatz zu dem in Abbildung 3-8 dargestellten Ergebnis für eine Hochregulierung des RAGE auf den THP-1 Zellen.

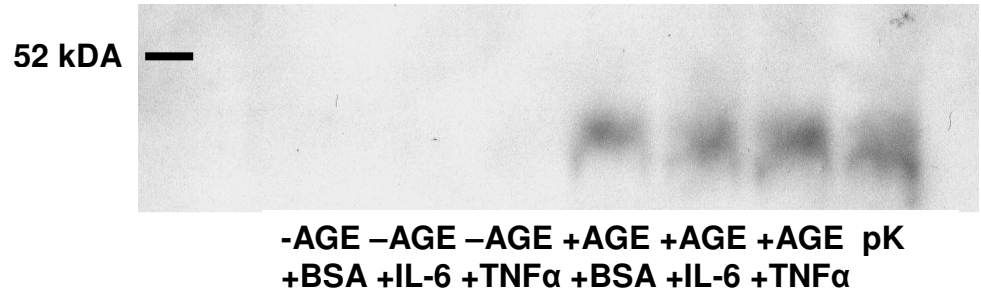


Abbildung 3-9: Western Blot der Membranfragmente nach 2000 ng/ml AGE-Vorinkubation für 24 h und Stimulation mit 10 ng/ml IL-6/TNFα für 48 h (n=5)

Im Western Blot zeigte sich bei den mit AGE vorstimulierten THP-1 Zellen nach Anti-RAGE-Färbung der PVDF-Membran eine Erhöhung des RAGE-Proteins. Positivkontrolle (pK): Extrakt eines Lungen-Aceton-Puders.

Weiterhin wurde untersucht, ob IL-6 und TNFα allein oder im Zusammenspiel mit AGE einen Einfluss auf die mRNA-Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 nehmen. Hierbei zeigte sich eine vergleichbare Entwicklung der ICAM-1-Expression wie bei den S100A8/A9-Werten. Es kam bereits unter IL-6/TNFα zu signifikant erhöhten ICAM-Werten, jedoch wiederum zu einer Verstärkung des Effekts bei vorheriger AGE-Inkubation. Anders als bei S100A8 und S100A9 fiel der Effekt hier für TNFα deutlicher aus als für IL-6 (Abb. 3-10).

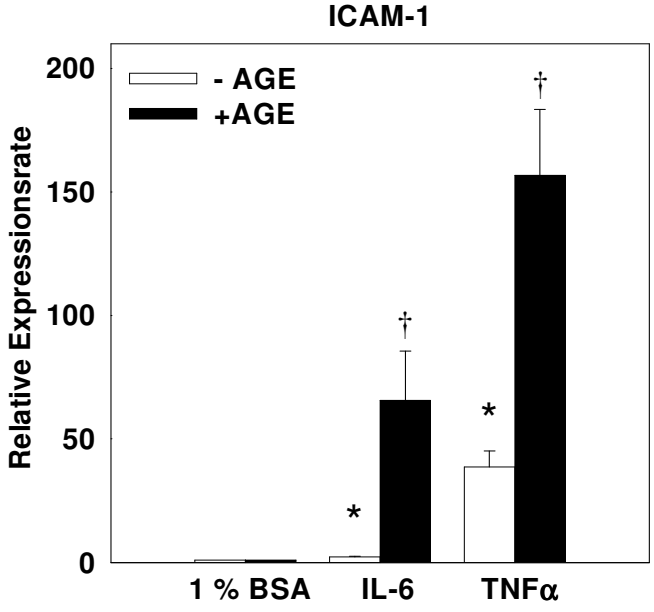


Abbildung 3-10: Expression der ICAM-1-mRNA nach 2000 ng/ml AGE-Vorstimulation für 24 h und Stimulation mit 10 ng/ml IL-6/TNFα für 48 h (n=5)

Die Expression von ICAM-1 war nach 48 h Stimulation ohne AGE-Vorbehandlung sowohl für IL-6 als auch für TNFα signifikant erhöht. Im Vergleich zu den AGE-unbehandelten Zellen zeigten die mit AGE vorinkubierten Gruppen ebenfalls eine signifikante Steigerung der ICAM-Expression, sowohl für IL-6 als auch für TNFα. Dargestellt sind mean und SEM; * $p<0,05$ Stimulation ohne AGE vs. BSA-Kontrolle ohne AGE; † $p<0,05$ Stimulation mit AGE vs. Stimulation ohne AGE.

Bei der mikroskopischen Inspektion zeigten sich bei diesem Versuch morphologische Veränderungen der THP-1 Zellen. Diese traten nur bei den mit AGE vorstimulierten und nachfolgend mit IL-6 und TNFα inkubierten Zellen auf. Deutlicher waren die Veränderungen in der Gruppe mit AGE- und TNFα-Stimulation festzustellen (Abb. 3-11 bis 3-13).

Abbildung 3-11 zeigt unveränderte THP-1 Zellen. Die Zellen lagen dicht gepackt vor und wiesen eine gleichmäßig runde, regelrechte Morphologie auf. Dies war zu beobachten wenn nicht mit AGE vorinkubiert wurde. Aber auch die mit AGE vorbehandelten Zellen verhielten sich unauffällig, wenn sie nicht zusätzlich mit Zytokinen stimuliert wurden.

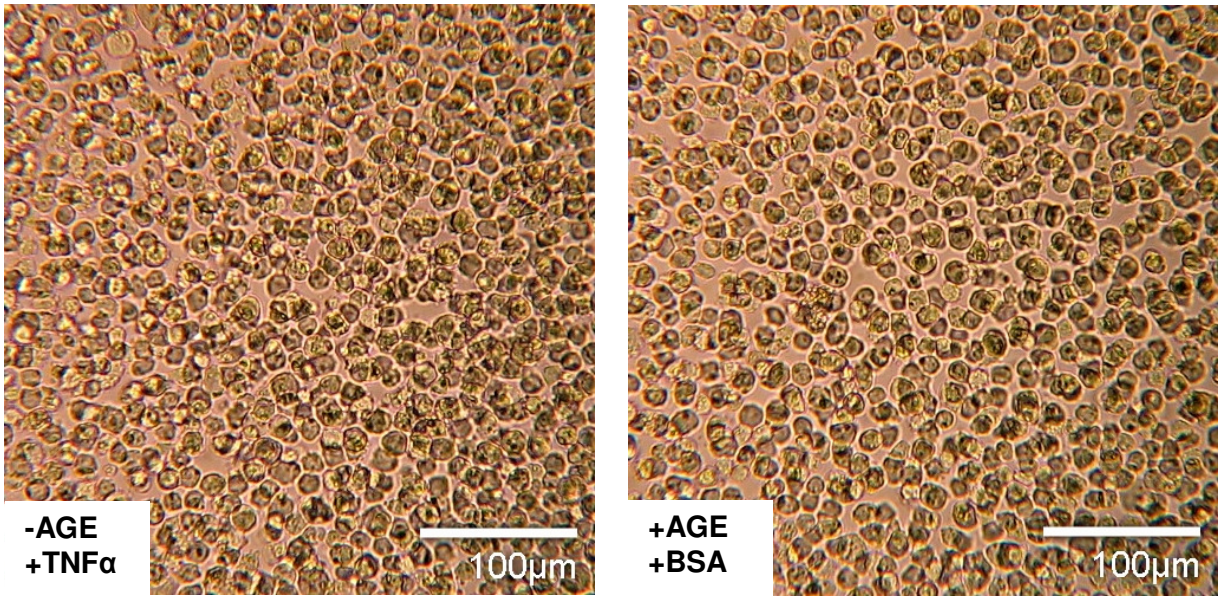


Abbildung 3-11: THP-1 Zellen nach alleiniger Stimulation mit TNFα (links) und AGE (rechts)
Die Bilder zeigen unveränderte THP-1 Zellen nach 72 h Versuch ohne AGE-Vorinkubation (links) und mit AGE vorbehandelt, jedoch ohne Zytokinstimulation (rechts).

Bei AGE- und anschließender IL-6-Stimulation zeigte sich bereits eine etwas geringere Dichte der Zellen, bei der TNFα-Inkubation waren jedoch deutlichere morphologische Veränderungen festzustellen. Nach dem 72-stündigen Versuch hatte die Zelldichte abgenommen und einzelne Zellen mit lang gestreckten Ausläufern wurden sichtbar. Diese waren wesentlich größer als die noch unveränderten Zellen und befanden sich am Boden der Gewebekulturschalen. Die unveränderten Zellen befanden sich dagegen in der Suspension. Eine vollständige Adhärenz der veränderten Zellen war jedoch nicht festzustellen (Abb. 3-12 und 3-13).

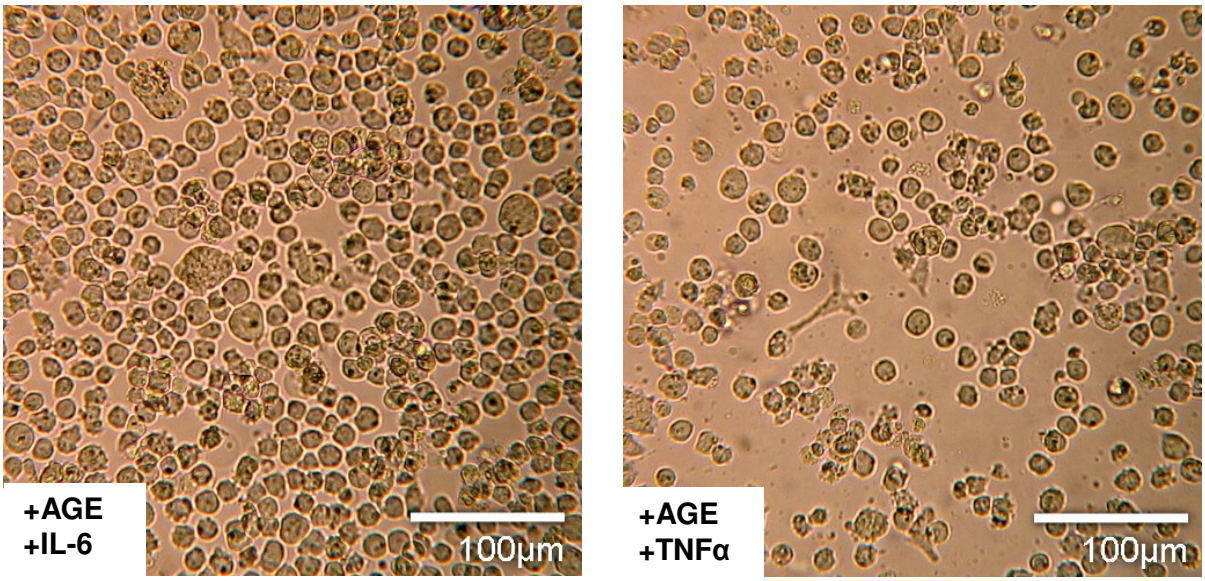


Abbildung 3-12: THP-1 Zellen nach 2000 ng/ml AGE-Vorstimulation für 24 h und Stimulation mit 10 ng/ml IL6 (links) und TNFα (rechts) für 48 h

Bei AGE- und IL-6-Stimulation wurde eine Abnahme der Zelldichte sichtbar. In der Bildmitte sind einzelne vergrößerte Monozyten zu erkennen. Unter TNFα-Stimulation nahm die Zelldichte weiter ab und einzelne deutlich veränderte Monozyten befanden sich am Boden der Kulturschalen.

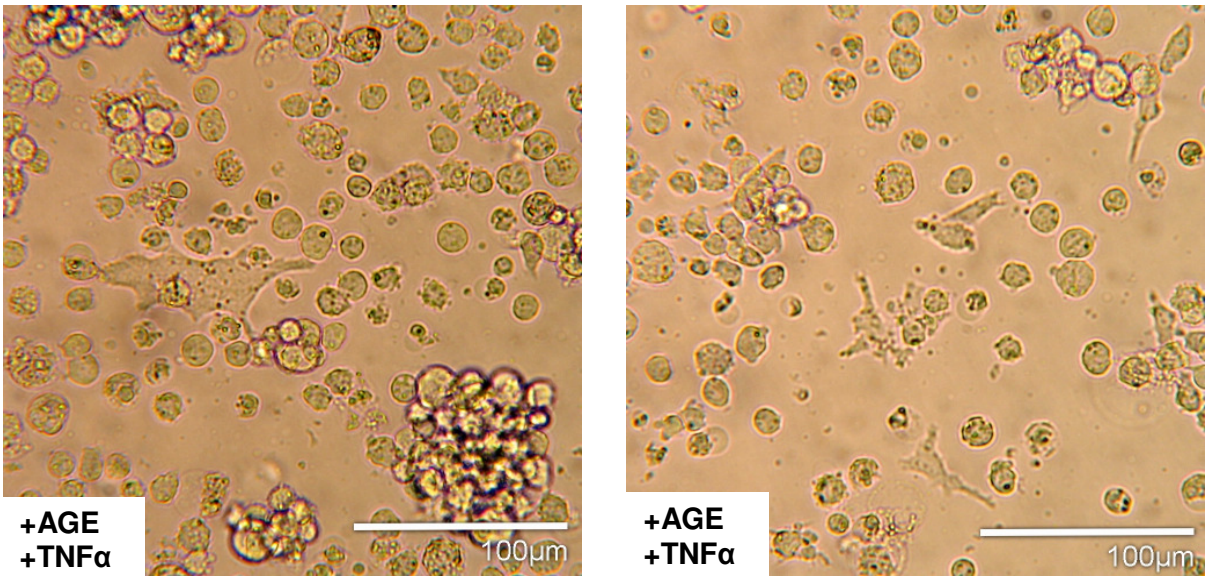


Abbildung 3-13: THP-1 Zellen nach 2000 ng/ml AGE-Vorstimulation für 24 h und Stimulation mit 10 ng TNFα für 48 h

Die Bilder zeigen die unter AGE- und TNFα-Gabe beobachteten Veränderungen in stärkerer Vergrößerung.

3.4 Hemmung des RAGE

Die Unterdrückung von AGE-vermittelten Effekten, durch eine RAGE-Blockade oder den Einsatz von löslichem RAGE (sRAGE), wurde einleitend beschrieben und zeigte bereits vielversprechende Erfolge im Tiermodell (Schmidt et al., 2000; Kislinger et al., 2001). Der abschließende Versuch sollte daher zeigen, ob die unter AGE-Wirkung erzielten Ergebnisse durch Blockierung des RAGE aufzuheben sind. Dazu wurden die Zellen wiederum für 24 h mit AGE vorinkubiert. Eine Stunde vor der Stimulation mit IL-6 und TNFα wurde nun ein monoklonaler Anti-RAGE-Antikörper (AK) in einer Konzentration von 5000 ng/ml eingesetzt. Der weitere Ablauf entsprach dem in Abschnitt 3.3 beschriebenen Versuch. Es bestätigten sich zum einen die bereits dargestellten Effekte von IL-6/TNFα und AGE auf die S100A8/A9-Expression. Zum anderen zeigte sich ein Ausbleiben des AGE-Effektes bei AK-Gabe. Zur besseren Lesbarkeit wurden hier die Ergebnisse für IL-6/TNFα und S100A8/S100A9 getrennt dargestellt (Abb. 3-14 bis Abb. 3-16).

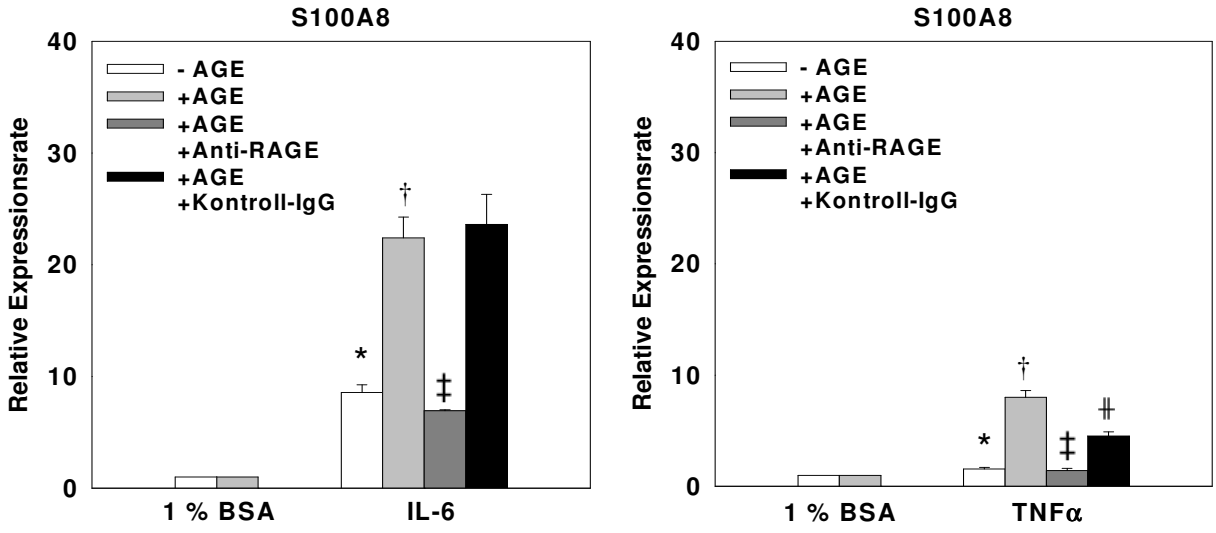


Abbildung 3-14: S100A8-mRNA-Expression nach 2000 ng/ml AGE-Vorstimulation für 23 h, Zugabe von 5000 ng/ml Anti-RAGE-AK für 1 h und Stimulation mit 10 ng/ml IL-6 (links) und TNFα (rechts) für 48 h (n=3)

Es bestätigten sich die bereits gezeigten Beobachtungen einer erhöhten S100A8-Expression unter Zytokingabe, sowie einer nochmals erhöhten Expression bei AGE-Vorstimulation. Bei zusätzlicher Anti-RAGE-AK-Gabe wurde der signifikante Anstieg der S100A8-Expression unter AGE-Gabe vollständig verhindert. Wurde anstelle des AK mit Kontroll-IgG inkubiert ergab sich wieder eine signifikant höhere Expression der S100A8-mRNA (in der Abb. ohne Symbol). Bei TNFα wurden jedoch auch signifikant niedrigere Werte für die Gruppe mit AGE und Kontroll-IgG im Vergleich zur Gruppe allein mit AGE beobachtet. Dies weist unter Umständen auf eine unerwünschte Beeinflussung der Zellen durch den Kontroll-AK hin. Dargestellt sind mean und SEM; * $p<0,05$ Stimulation ohne AGE vs. BSA-Kontrolle ohne AGE; † $p<0,05$ Stimulation mit AGE vs. Stimulation ohne AGE; ‡ $p<0,05$ Stimulation mit AGE und Anti-RAGE-AK vs. Stimulation mit AGE; ╫ $p<0,05$ Stimulation mit AGE und Kontroll-IgG vs. Stimulation mit AGE.

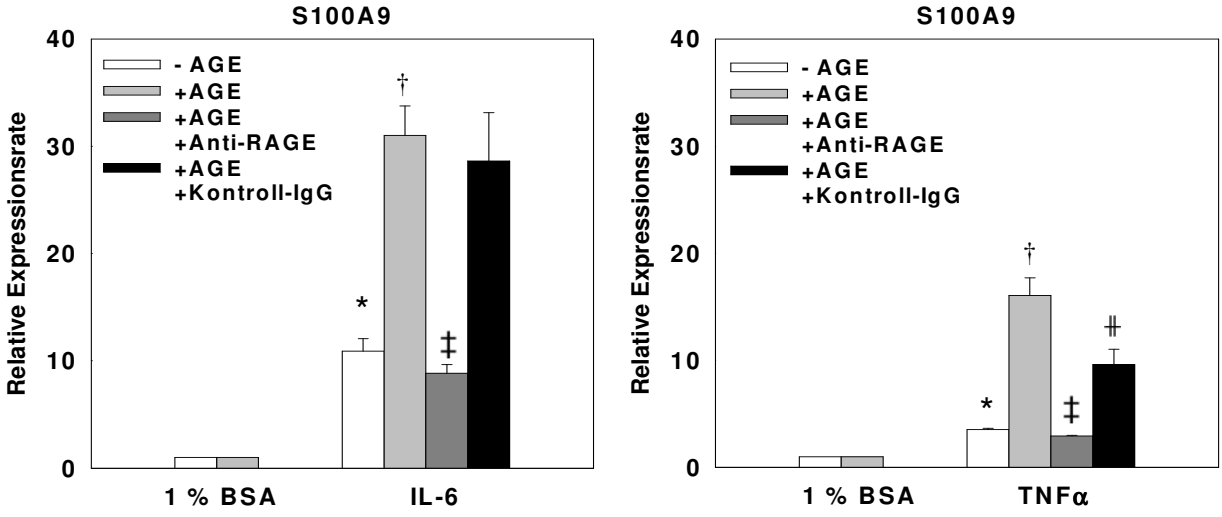


Abbildung 3-15: S100A9-mRNA-Expression nach 2000 ng/ml AGE-Vorstimulation für 23 h, Zugabe von 5000 ng/ml Anti-RAGE-AK für 1 h und Stimulation mit 10 ng/ml IL-6 (links) und TNFα (rechts) für 48 h (n=3)

Auch hier konnte die bereits gezeigte Expressionssteigerung von S100A9 nach Zytokin-, sowie nach AGE-Inkubation belegt werden. Wie bei S100A8 bewirkte die Zugabe des Anti-RAGE-AK auch bei S100A9 eine signifikant niedrigere mRNA-Synthese als bei AGE-Gabe ohne AK. Wurde mit AGE und Kontroll-IgG inkubiert, war die Expression signifikant höher im Vergleich zur Gruppe mit AGE und AK (in der Abb. ohne Symbol). Für TNFα ergaben sich jedoch auch hier signifikant niedrigere Werte für die Gruppe mit AGE und Kontroll-IgG im Vergleich zur Gruppe allein mit AGE. Dargestellt sind mean und SEM; * $p<0,05$ Stimulation ohne AGE vs. BSA-Kontrolle ohne AGE; † $p<0,05$ Stimulation mit AGE vs. Stimulation ohne AGE; ‡ $p<0,05$ Stimulation mit AGE und Anti-RAGE-AK vs. Stimulation mit AGE; ╫ $p<0,05$ Stimulation mit AGE und Kontroll-IgG vs. Stimulation mit AGE.

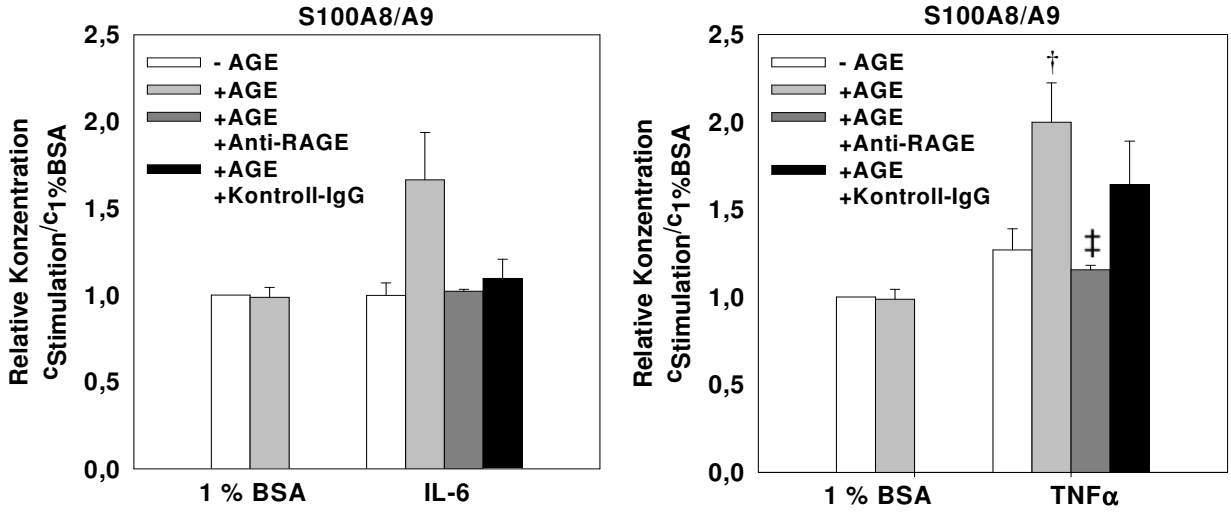


Abbildung 3-16: S100A8/A9 im Überstand nach 2000 ng/ml AGE-Vorstimulation für 23 h, Zugabe von 5000 ng/ml Anti-RAGE-AK für 1 h und Stimulation mit 10 ng/ml IL-6 (links) und TNFα (rechts) für 48 h (n=3)

Im Überstand ergaben sich nur für TNFα signifikant abweichende S100A8/A9-Konzentrationen zwischen den Gruppen ohne und mit AGE. Nach Anti-RAGE-AK-Gabe erfolgte eine geringere Abgabe des Heterodimers aus S100A8/A9 in den Überstand, jedoch war diese Veränderung wiederum nur für TNFα statistisch signifikant. Dargestellt sind mean und SEM; † $p<0,05$ Stimulation mit AGE vs. Stimulation ohne AGE; ‡ $p<0,05$ Stimulation mit AGE und Anti-RAGE-AK vs. Stimulation mit AGE.

Der Analyse der S100A8/S100A9-Expression und Messung der Heterodimerkonzentration im Überstand folgte die Untersuchung der RAGE-mRNA. Wie in Abbildung 3-8 dargestellt, zeigte die Quantifizierung der mRNA jedoch auch hier keine signifikanten Änderungen der RAGE-Expression unter Zytokin-, AGE- oder AK-Gabe (Abb. 3-17).

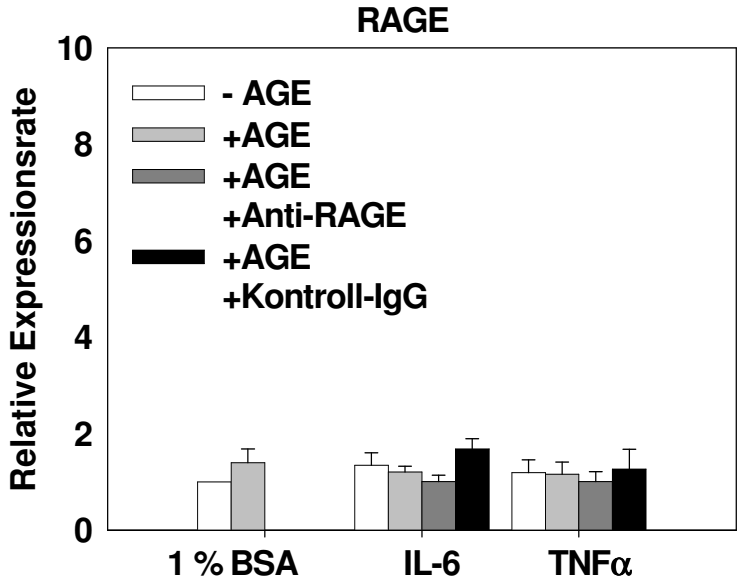


Abbildung 3-17: RAGE-mRNA-Expression nach 2000 ng/ml AGE-Vorstimulation für 23 h, Zugabe von 5000 ng/ml Anti-RAGE-AK für 1 h und Stimulation mit 10 ng/ml IL-6/TNFα für 48 h (n=3)
Es zeigten, vergleichbar mit Abbildung 3-8, auch hier die einzelnen Kontroll- und Stimulationsgruppen keine signifikanten Unterschiede in ihrer RAGE-mRNA-Expression.

Abschließend wurde der Effekt des Anti-RAGE-AK auf die ICAM-1-Expression untersucht. Es konnte wie bei S100A8/S100A9 auch hier eine Unterdrückung des AGE-induzierten Effektes festgestellt werden. Die Expression des Adhäsionsmoleküls ging auf die Werte der alleinigen Stimulation mit IL-6 und TNFα zurück (Abb. 3-18).

Mikroskopisch wurden die im Versuch 3.3 beschriebenen Auffälligkeiten bezüglich der Zellform der THP-1 Zellen auch in diesem Versuch beobachtet. Unter Anti-RAGE-AK-Gabe blieben die Zellen morphologisch unauffällig.

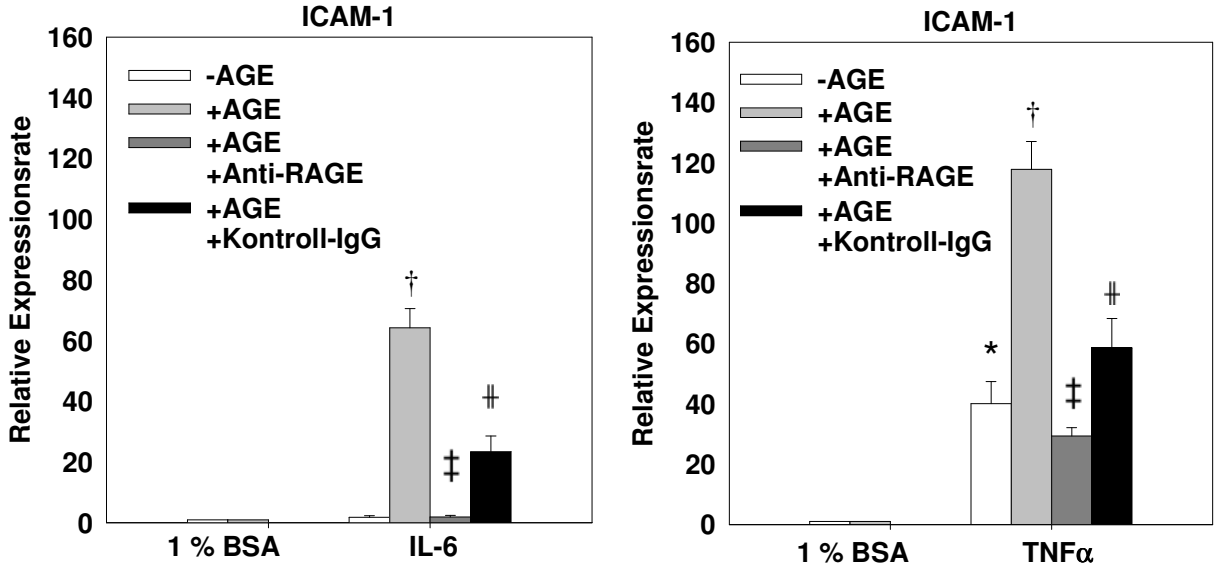


Abbildung 3-18: ICAM-1-mRNA-Expression nach 2000 ng/ml AGE-Vorstimulation für 23 h, Zugabe von 5000 ng/ml anti-RAGE für 1 h und Stimulation mit 10 ng/ml IL-6 (links) und TNFα (rechts) für 48 h (n=3)

Die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 war signifikant niedriger bei AGE- und Anti-RAGE-AK-Gabe im Vergleich zur Gruppe allein mit AGE. Sie war auch signifikant niedriger im Vergleich zur Kontroll-IgG-Gruppe (in der Abb. ohne Symbol). Es zeigte sich allerdings, ähnlich wie für S100A8/S100A9 und TNFα beobachtet, die ICAM-1-Expression in der Kontroll-IgG-Gruppe wiederum signifikant unterschiedlich zur Gruppe allein mit AGE. Dargestellt sind mean und SEM; * $p<0,05$ Stimulation ohne AGE vs. BSA-Kontrolle ohne AGE; † $p<0,05$ Stimulation mit AGE vs. Stimulation ohne AGE; ‡ $p<0,05$ Stimulation mit AGE und Anti-RAGE-AK vs. Stimulation mit AGE; ╫ $p<0,05$ Stimulation mit AGE und Kontroll-IgG vs. Stimulation mit AGE.

4 Diskussion

Durch die Identifizierung der Atherosklerose als entzündliche Erkrankung (Ross, 1999) gewann die Untersuchung inflammatorischer Prozesse im Herz-Kreislauf-System zunehmend an Bedeutung. In letzter Zeit wurde hierbei die Rolle der calciumbindenden S100-Proteine im Rahmen chronisch inflammatorischer Vorgänge erkannt (Foell et al., 2004). S100A8 und S100A9 stellen zwei, bevorzugt in heterodimerer Form vorliegende Mitglieder dieser Proteinfamilie dar. Sie wirken unter anderem als Chemotaktika und werden von Neutrophilen und aktivierten Monozyten exprimiert (Zwadlo et al, 1988; Rammes et al., 1997). Vermutet wird eine mit S100A8/A9 im Zusammenhang stehende Adhäsion und transendotheliale Migration der Monozyten, die außerdem abhängig ist von vermehrter ICAM-1-Produktion durch Endothelzellen (Eue et al., 2000). Dass die Präsenz von S100A8/A9 nicht nur Konsequenz der Inflammation ist, vielmehr das Heterodimer an der Generation der Entzündungsantwort selbst beteiligt zu sein scheint, zeigten Vandal et al. am Mausmodell. So führte LPS hier zur Ausschüttung von S100A8/S100A9 und zur Freisetzung und Migration neutrophiler Granulozyten, wobei Antikörper gegen S100A8/S100A9 diesen Vorgang unterdrückten (Vandal et al., 2003).

S100-Proteine wurden als Liganden des Rezeptors für AGE (RAGE) identifiziert. RAGE ist Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie und wird unter anderem mit der Leukozytenadhäsion an Endothelzellen und monozytärer transendothelialer Migration assoziiert (Chavakis et al., 2003; Rouhiainen et al., 2004). Der Rezeptor erhielt seinen Namen, da er ursprünglich nur mit der Ansteuerung durch Advanced Glycation End Products (AGEs) in Verbindung gebracht wurde (Schmidt et al., 1992; Neeper et al., 1992). AGEs stellen dabei eine heterogene Gruppe kreuzvernetzter Produkte dar und entstehen im Rahmen von Alterungsprozessen. Aber auch persistierende Hyperglykämien, wie unter diabetischen Bedingungen, bieten ideale Voraussetzungen für die Entstehung von AGEs (Bierhaus et al., 1998). Ihre Akkumulation findet anschließend zum Beispiel in renalen Glomeruli, der Retina und peripheren Nerven statt (Thornalley et al., 2003). Das Bestehen eines solchen Überangebotes an Liganden führt in der Konsequenz zu einer beachtlichen Steigerung der RAGE-Expression und trägt bei Diabetes-Patienten nachweislich zu einer chronischen „low-grade“ Inflammation bei (Stehouwer et al., 2002; Ahmed et al., 2007).

Die AGE-Beteiligung im Rahmen von Gefäßerkrankungen wurde bereits auf verschiedene Weise gezeigt. So konnten sowohl erhöhte AGE-Konzentrationen, eine in vitro gezeigte Induktion zellulärer Dysfunktionen durch AGEs und die Unterdrückung der Komplikationen durch AGE-Inhibitoren nachgewiesen werden (Ahmed et al., 2007). Die Wirkung von AGE-Hemmstoffen untersuchten auch Figarola et al.. Sie zeigten zunächst, dass S100B die Expression von RAGE in Monozyten stimuliert. Weiterhin kam es unter anderem zu einer gesteigerten MCP-1-Expression und zur Aktivierung von NF-kB, jedoch nicht bei Zugabe des AGE-Inhibitors LR-90. Ferner erkannten sie, dass LR-90 auch die durch AGEs und S100B induzierte Adhärenz der Monozyten verhindern kann, welche als erster Schritt zur Reifung der Monozyten in Makrophagen gilt (Figarola et al., 2007).

Das Zusammenspiel verschiedener atheroskleroseinduzierender Faktoren wird in dem von Schmidt et al. postulierten Two-Hit-Modell deutlich. So gilt die RAGE-Aktivierung als erster Schritt, begünstigt durch die bereits beschriebene AGE-Überladung unter diabetischen Zuständen, aber auch bei Patienten mit Niereninsuffizienz. Die nachhaltige Initiierung der zellulären Funktionsstörung benötigt aber einen weiteren Reiz, der beispielsweise durch proinflammatorische Zytokine gegeben sein kann (Schmidt et al., 2000).

Experimentelle Untersuchungen mit Kombinationen aus AGEs und Entzündungsmediatoren wie IL-6 und TNFα bieten folglich einen viel versprechenden Ansatz, um proatherogene Vorgänge an zirkulierenden Abwehrzellen aufzuzeigen. Neben neutrophilen Granulozyten sind Monozyten die ersten Immunzellen die entzündliche Läsionen infiltrieren. In dieser Arbeit erfolgte daher die Untersuchung der S100A8/S100A9-Expression an THP-1 Zellen, einer humanen Zelllinie mit ausgeprägten Monozytenmarkern. Neben den Mechanismen, die zur Ausschüttung der beiden S100-Proteine durch Monozyten führen, wurden die Effekte der AGEs auf die THP-1 Zellen dargestellt. Weiterhin wurden Beziehungen zum RAGE sowie dem Adhäsionsmolekül ICAM-1 und der Sekretion des S100A8/A9-Heterodimers hergestellt.
Aus den im Folgenden diskutierten Ergebnissen lässt sich ein denkbares Teilmodell für die Monozytenaktivierung im Rahmen von Inflammationsgeschehen ableiten. In Abbildung 4-1 ist dieses Modell im Zusammenhang mit der Endothelzellaktivierung dargestellt.

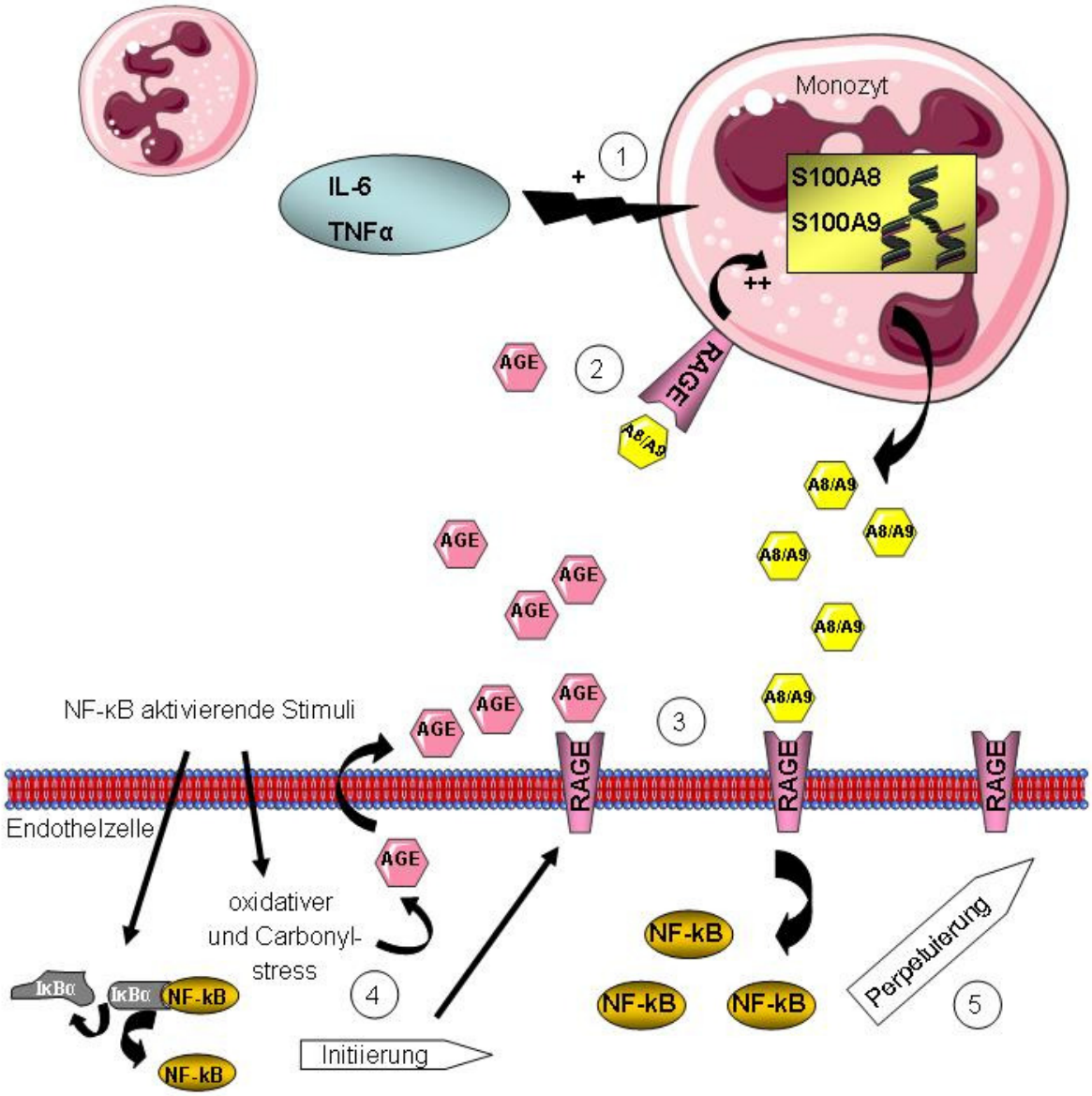


Abbildung 4-1: Modell der Endothelzellaktivierung unter Einbeziehung der am lokalen Inflammationsgeschehen beteiligten Monozyten

Die Ziffern 1-4 stellen keine zeitliche Reihenfolge dar.

1) Monozyten erhalten proinflammatorische Stimuli in Form von Zytokinen, hier IL-6 und TNFα. Dies führt zu einer gesteigerten Expression von S100A8/S100A9-mRNA, Proteinsynthese und anschließender Sekretion und Formierung des Heterodimers.

2) In Gegenwart von AGEs kommt es zu einer Hochregulierung des RAGE an den Monozyten. Der vermehrt vorhandene Rezeptor bindet nun S100A8/S100A9 und führt effektiv zu einer Verstärkung des Expressions- und Sezernierungsprozesses von S100A8/S100A9.

3) An der Endothelzelle wurde ebenfalls RAGE durch AGE hochreguliert gefunden. Weiterhin findet auch hier eine Bindung von S100A8/S100A9 statt (Ehlermann et al., 2006).

4) Die Endothelzellaktivierung durch AGEs und S100A8/S100A9 über RAGE beinhaltet unter anderem die Aktivierung von NF-κB. Dazu ist ein weiterer Stimulus als so genannter „second hit" notwendig. Dieser kann beispielsweise durch oxidativen Stress oder modifizierte Lipoproteine gegeben sein (Schmidt et al., 2000).

5) Die dargestellten Mechanismen führen letztlich zu einer lang anhaltenden Aktivierung der Endothelzellen.

4.1 S100A8/S100A9-Expression unter Einfluss von Zytokinen und AGEs

AGEs allein führten zu keiner gesteigerten Expression der S100A8/S100A9-mRNA im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Zytokine IL-6 und TNFα konnten jedoch eine Expressionsteigerung herbeiführen. Im Vergleich stimulierte IL-6 die THP-1 Zellen schneller und führte auch zu höheren relativen Expressionsraten als TNFα. Generell wurden für S100A9 etwas höhere Expressionsraten nachgewiesen. Insgesamt verhielten sich die beiden S100-Proteine jedoch in ihrer Antwort auf alle Stimuli prinzipiell gleich. Bis 48 h IL-6-Inkubation ließ sich noch kein zeitabhängiges Maximum erkennen. Für TNFα dagegen scheint dieses bei 24 h erreicht, zu der 48 h-Stimulationsgruppe war kein signifikanter Unterschied mehr feststellbar. IL-6 scheint damit die Expression der beiden proinflammatorischen S100-Proteine lang anhaltender zu fördern. Obwohl mit drei verschiedenen IL-6-Konzentrationen stimuliert wurde, konnten keine signifikanten dosisabhängigen Unterschiede festgestellt werden, wenngleich die Expressionsraten für die mittlere IL-6-Konzentration von 10 ng/ml meist etwas höher ausfielen.

Der Nachweis von S100A8 und S100A9 in atherosklerotischen Plaques (McCormick et al., 2005) unterstützt den hier gefundenen Zusammenhang zu IL-6 und TNFα. Die beiden Zytokine spielen bekanntermaßen eine Mediatorenrolle bei entzündlichen Prozessen, wie sie auch die Atherosklerose darstellt. Ähnliche Beobachtungen machten Xu et al. an murinen Makrophagen, die eine verstärkte S100A8-Expression durch IL-10 und TNFα nachwiesen (Xu et al., 2000; 2001). Für das auch als EN-RAGE bezeichnete S100A12 wurde an THP-1 Zellen ebenfalls eine Expressionssteigerung nach IL-6-Stimulation gezeigt (Hasegawa et al., 2003). Auffällig war daher vielmehr die seitens der THP-1 Monozyten ohne Reaktion verlaufende AGE-Stimulation. Im Vergleich zu anderen Arbeiten, bei denen beispiels-weise mit 600 µg/ml AGE stimuliert wurde (Basta et al., 2002; Pertyńska-Marczewska et al, 2004) kamen hier geringere AGE-Konzentrationen von 1-4 µg/ml zum Einsatz. Jedoch wurden klinisch, beispielsweise von Yamagishi et al., ebenfalls AGE-Konzentrationen um 8 µg/ml gemessen. Vergleichbar sind die Beobachtungen von Makita et al., die etwa 10 µg/ml AGE im Serum von gesunden Patienten und 25 µg/ml AGE bei Diabetikern fanden (Makita et al., 1992; Yamagishi et al., 2006). Die in dieser Arbeit verwendeten AGE-Konzentrationen entsprechen damit eher den klinisch gemessenen Werten. Einerseits wurde gezeigt, dass diese niedrigen AGE-Konzentrationen in vitro nicht in der Lage

sind, die Expression der proinflammatorischen Proteine S100A8/A9 zu steigern. Andererseits sind jedoch die erzielten Effekte mit Kombinationen aus AGEs und Zytokinen ein Zeichen für die hohe Sensitivität dieser Mechanismen.

Im Überstand konnte eine zeitabhängige Akkumulation des Heterodimers aus S100A8 und S100A9 nachgewiesen werden. Es zeigten sich jedoch erst spät, nach 24 h bei TNFα Stimulation und 48 h bei IL-6 Stimulation, signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe. Folglich fand zunächst nur eine basale S100A8/A9-Sekretion und Akkumulation des Proteins im Überstand statt. Eventuell wird für die Umsetzung der erhöhten Expression in eine gesteigerte Sekretion eine größere Zeitspanne benötigt. Dafür spricht, dass ab 24 h, bzw. 48 h Inkubation signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe deutlich wurden. Der Beginn der Sekretion nach einem TNFα-Stimulus liegt offensichtlich vor dem Zeitpunkt für IL-6. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass die Expression der S100A8/S100A9-mRNA bei IL-6 früher beginnt als bei TNFα und daher auch eine frühere Sekretion vermuten lässt. Dies konnte jedoch, wie bereits dargestellt, nicht beobachtet werden.

4.2 Effekte der AGEs

AGEs begünstigen das Auftreten vaskulärer Dysfunktionen auf vielfältige Weise. Dies geschieht beispielsweise durch Endothelzellaktivierung mit anschließender Adhäsionsmolekül-Expression, der Aktivierung von NF-kB sowie der Produktion proinflammatorischer Mediatoren (Basta et al., 2002; Zieman et al., 2005). Im Rahmen dieser experimentellen Arbeit wurde nun auch eine Interaktion mit proinflammatorischen Zytokinen gefunden, die einen direkten Einfluss auf das Verhalten der Monozyten ausübte. Während die Zytokine bereits eine S100A8/A9-Expressionssteigerung verursachten, führte eine zusätzliche Vorstimulation der THP-1 Zellen mit AGEs zu einer bemerkenswerten Verstärkung der Reaktion. Die Expressionsraten erhöhten sich um das etwa 7,5-fache für IL-6 und das 7,3-fache (S100A8) beziehungsweise 9,3-fache (S100A9) für TNFα. IL-6 vermochte auch hier höhere relative Expressionsraten zu bewirken.

Bei der Bestimmung der S100A8/A9-Konzentrationen im Überstand zeigte sich hier zunächst dieselbe Problematik wie in Abschnitt 4.1 dargestellt. Nach 48 h Zytokinstimulation war in den Kontrollgruppen ohne AGE-Gabe nur bei TNFα eine signifikante Erhöhung festzustellen. Die Werte für IL-6 wichen dagegen kaum von den Werten der

Lösungsmittelkontrolle ab. Die Vorstimulation mit AGEs bewirkte jedoch auch hier für beide Zytokinstimulationen einen Anstieg der Heterodimerkonzentration, der aber nur für IL-6 signifikant ausfiel. Anscheinend vermag IL-6 allein die Expression von S100A8/A9 bereits nach 4h Stimulation deutlich zu steigern, die Sekretion wird jedoch zunächst nicht angeregt. Dazu ist ein zweiter Stimulus, wie hier in Form einer AGE-Vorinkubation, nötig.

Dass die Proteine vor der ELISA-Messung abgebaut wurden, muss ebenfalls als Fehlerquelle in Betracht gezogen werden. Allerdings werden nur Homodimere aus S100A8 und S100A9 leicht durch Proteasen aufgespalten, wohingegen das Heterodimer aus S100A8/A9 eine hohe Proteaseresistenz zeigt. Bekanntlich sind an Orten der Inflammation zahlreiche Proteasen aktiv, um sich an Gewebeumbau und Abräumarbeiten zu beteiligen. Daher kann für ein extrazellulär wirkendes pro-inflammatorisches Heterodimer eine Proteasestabilität angenommen werden (Nacken et al., 2007). Dies spricht gegen einen vorzeitigen S100A8/A9-Abbau.

Weitherhin besteht aber die Möglichkeit, dass unter den vorherrschenden Zellkulturbedingungen S100A8 und S100A9 getrennt, in Form von Homodimeren oder andersartig geordneten Komplexen sezerniert wurden. Diese konnten möglicherweise vom ELISA-Antikörper nicht erkannt werden. Letztlich erscheinen jedoch die Hypothesen einer erst später beginnenden Sekretion oder aber einer zu starken Verdünnung des Heterodimers im Überstand die wahrscheinlichsten Erklärungen für den unzureichenden Nachweis der Proteine zu sein.

Der Western Blot der Membranfragmente zeigte eine Hochregulierung des RAGE bei allen mit AGE vorinkubierten Monozyten. Wie am Endothel und am Tiermodell in atherosklerotischen Plaques bereits beobachtet (Park et al., 1998; Ehlermann et al., 2006), führen AGEs also auch an Monozyten zu verstärkter Expression oder vermehrtem Einbau des RAGE. Die vermutete Expressionssteigerung konnte jedoch in der RT-PCR nicht nachgewiesen werden. Damit wurde keine erhöhte RAGE-Expression gezeigt, obwohl der Western Blot für alle mit AGE vorinkubierten Zellen eine RAGE-Hochregulierung belegte.

Hinsichtlich dieser Problematik sind drei mögliche Erklärungen zu diskutieren. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass die Expression des Rezeptors gar nicht gesteigert wird und die Rezeptorproteine oder ihre Vorstufen bereits im Zytoplasma der Zelle

gespeichert sind. Anschließend werden sie bei entsprechendem AGE-Stimulus aktiviert und in die Zellmembran eingebaut. Zum anderen wurde eventuell der Expressionszeitpunkt nicht erfasst, da die mRNA erst nach Ablauf des 72-stündigen Versuches untersucht wurde. Denkbar ist außerdem, dass die Primersequenz des AGE-Rezeptors nicht mit dem hier aktivierten RAGE übereinstimmt. In der Literatur finden sich diesbezüglich zahlreiche, teilweise widersprüchliche Angaben. So wird einerseits nur vom „RAGE“ als dem Rezeptor für AGE gesprochen (Schmidt et al., 2000), andererseits wird in verschiedene AGE-Rezeptoren differenziert. So unterteilt Vlassara in AGE-R1, AGE-R2, AGE-R3 (auch als Galectin-3 bezeichnet) und RAGE, neben den ebenfalls AGE-bindenden Scavenger Rezeptoren und Lysozym (Vlassara et al., 2001). Für die RT-PCR wurde hier die Primersequenz verwendet, die laut Herstellerangaben mit der Sequenz des vom RAGE angesteuerten Rezeptors übereinstimmt (MAB5328, Fa. Chemicon). Möglich ist aber, dass der verwendete Antikörper nicht spezifisch nur einen AGE-Rezeptor blockiert, sondern die Konformation für mehrere Rezeptoren passt. Für die PCR wird allerdings die exakte Primersequenz benötigt, um die Rezeptor-mRNA zu amplifizieren. Dies ist insofern problematisch, dass Einteilung, Beschreibung und Aufbau der verschiedenen AGE-Rezeptoren nicht vollständig geklärt sind (Vlassara et al., 2001).

Neben der auffälligen Steigerung der S100A8/S100A9-Expression waren auch morphologische Veränderungen der Zellen auszumachen. So scheint die kombinierte AGE- und Zytokingabe zu einer Aktivierung der Zellen zu führen. Diese äußerte sich in abnehmender Zelldichte, Auftauchen von vereinzelten größeren Zellen und Zellen mit lang gezogenen Ausläufern, die an adhärente Zellen erinnern. Vollständige Adhärenz konnte jedoch nicht festgestellt werden. Unterstützt wurden die mikroskopisch gefundenen Zellveränderungen durch die Ergebnisse für die ICAM-1-Expression. Es konnte eine stark gesteigerte Expression des Adhäsionsmoleküls, das auf zukünftige Aktivierung und Adhäsion der Monozyten abzielt, bei AGE-Vorinkubation und anschließendem Zytokinstimulus festgestellt werden. Interessanterweise wurden hier, im Vergleich zu IL-6, höhere ICAM-1-Werte für TNFα beobachtet, parallel zu den stärker ausgeprägten morphologischen Zellveränderungen der mit AGE und TNFα stimulierten Gruppen.

Zusammenfassend zeigte der Vergleich beider Zytokinwirkungen eine stärkere Expression der S100A8- und S100A9-mRNA für IL-6. Dagegen erschien die Monozytenaktivierung insgesamt bei TNFα ausgeprägter. Es konnten hier höhere S100A8/A9-Konzentrationen im Überstand gemessen werden, die ICAM-1-Expression wurde stärker stimuliert und auch die morphologischen Veränderungen der Monozyten waren deutlicher erkennbar. Diese differenzierte Antwort wirft die Frage nach einer eventuellen Toxizität der TNFα-Konzentration auf. Eine mögliche Zellschädigung, besonders bei kombinierter AGE-Gabe, sollte in Betracht gezogen werden. Im Vergleich wurden aber murine Makrophagen schon mit TNFα-Konzentrationen um 25ng/ml stimuliert (Xu et al., 2000). Die veränderten Zellen stellten überdies keine Mehrheit dar und verblieben am Ende des Versuches hauptsächlich am Boden der Schalen, da die Zellsuspension stets in gleicher Weise abgenommen wurde. Sie wurden daher bei der Auswertung größtenteils nicht berücksichtigt. Die erhöhten Expressionsraten für S100A8/A9 und ICAM-1 wurden also an den morphologisch unveränderten Zellen nachgewiesen. Auch das für die RT-PCR verwendete Referenzgen, humanes ß-Actin, verhielt sich in allen Kontroll- und Stimulationsgruppen konstant.

Die gewonnenen Erkenntnisse schließen sich bisherigen Beobachtungen an, die eine RAGE-Aktivierung, assoziiert mit zellulärer Aktivierung und der Expression von Adhäsionsmolekülen zeigten (Schmidt et al., 2000). Auch die Adhäsion von Monozyten konnte mit S100A8/S100A9 und einem ICAM-1-Anstieg bereits in Verbindung gebracht werden. Allerdings wurde hier die ICAM-1 Hochregulierung am Endothel beschrieben (Eue et al., 2000). Im Rahmen dieser Versuche konnte nun dieser ICAM-1-Effekt auch für die monozytäre Seite gezeigt werden. Malizia et al. postulierten bereits einen Zusammenhang zwischen der Immunaktivierung und der ICAM-1-Expression in mononukleären Phagozyten. Goebeler et al. beschrieben am Mausmodell eine erhöhte ICAM-1-Expression im Zusammenhang mit der Differenzierung von Monozyten. Diese konnte unter anderem durch TNFα induziert werden (Malizia et al., 1991; Goebeler et al., 1993). Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Aktivierung der humanen Monozyten dagegen nur bei Kombination von TNFα mit AGEs beobachtet werden.

In der Literatur finden sich gegensätzliche Beobachtungen in Bezug auf die Einzelfunktionen von S100A8 und S100A9. Beispielsweise wird einerseits von negativer Regulation der Neutrophilenadhäsion durch S100A8 über die Heterodimerbildung gesprochen, während S100A9 dieselbe fördert (Newton et al., 1998). Andererseits

wurde eine Monozytenaktivierung auch durch S100A8/A9 induziert beschrieben und nur S100A8 allein scheint hier nicht involviert zu sein (Eue et al., 2000). Donato wiederum spricht von einer Inhibition der Makrophagen-Aktivierung durch das S100A9-Monomer (Donato, 2003). Da bei der hier durchgeführten Stimulation jeweils beide Proteine vermehrt exprimiert wurden und im Überstand das Heterodimer bestimmt wurde, war mit dem vorliegenden Versuchsaufbau keine Möglichkeit gegeben, beispielsweise die ICAM-1-Hochregulation differenziert zu betrachten. Weitere Arbeiten werden hier zeigen müssen, ob die ICAM-1-Steigerung direkt mit den S100-Proteinen assoziiert ist und ob ein einzelnes Protein oder doch das Heterodimer ursächlich beteiligt ist.

4.3 Wirkung des RAGE-AK

Aus den bisherigen Ergebnissen lässt sich ein hypothetischer Zusammenhang zwischen der in Abschnitt 4.2 dargestellten Aktivierung der Monozyten und der RAGE-Hochregulierung ableiten. An HUVECs wurde bereits über RAGE und HMGB1 eine Expression von ICAM-1, VCAM-1 und die Sekretion von IL-8 und G-CSF nachgewiesen, welche durch einen RAGE-Antikörper (RAGE-AK) teilweise inhibiert werden konnte (Treutiger et al., 2003). Eine weitere Studie von Isoda et al. zeigte, dass AGE-LDL unter anderem die MCP-1 vermittelte Chemotaxis in THP-1 Zellen stimuliert. Auch hier konnte die zelluläre Antwort mit Hilfe eines RAGE-AK unterdrückt werden (Isoda et al., 2007). Hinsichtlich dieser Fragestellung sollte nun ein abschließender Versuch mit einem RAGE-AK zeigen, ob auch hier die AGE-vermittelten Effekte über eine RAGE-Blockade verhindert werden können.

Der RAGE-AK wurde 23 h nach AGE-Vorstimulation in die Zellsuspension gegeben. Damit blieb den Monozyten Zeit für eine AGE-induzierte RAGE-Hochregulierung. Die Reaktion auf den folgenden Zytokinreiz bei gleichzeitiger RAGE-Blockade sollte dann Aufschluss darüber geben, ob RAGE in den Verstärkungsprozess der S100A8/A9-Expression involviert ist. Es zeigte sich das erwartete Ausbleiben der unter AGE beobachteten Expressionssteigerung von S100A8/A9. Die Auswertungen der Überstände im ELISA bestätigten die Ergebnisse der RT-PCR. Auch hier war eine deutlich geringere S100A8/A9-Sekretion unter RAGE-AK-Gabe festzustellen. Das Ausmaß der Sekretion ist also offensichtlich direkt von der Expressionsrate abhängig. Die Blockierung des RAGE verspricht damit sowohl eine Unterdrückung der S100A8/S100A9-Synthese, als auch der Abgabe des Heterodimers durch die THP-1

Zellen. Auch die AGE-induzierte ICAM-1-Expressionssteigerung konnte durch den RAGE-AK vollständig unterdrückt werden.

Die Kontroll-AK-Gabe diente dem Nachweis der Spezifität dieses Versuches für den RAGE-AK. Der Kontroll-AK konnte generell keine Unterdrückung des AGE-Effekts herbeiführen. Trotzdem zeigten sich sowohl in der RT-PCR, als auch im ELISA teilweise Unterschiede zwischen den AGE- und den Kontroll-AK-Gruppen. Dieses Phänomen konnte bisher nicht geklärt werden. In weiteren Versuchen muss daher untersucht werden, ob diese Veränderungen ein zufälliges Phänomen darstellten oder ob eine echte Interaktion des Kontroll-AK mit dem RAGE, beziehungsweise anderen physiologischen Zellmechanismen vorliegt. Fakt ist jedoch eine eindeutige Inhibition der AGE-Effekte durch den RAGE-AK, die in diesem Maße vom Kontroll-AK nicht erreicht wurde. Die mikroskopische Inspektion bestätigte weiterhin den Erfolg der Blockade durch den RAGE-AK. So verhielten sich die Zellen unter Antikörpergabe wie unter Vorstimulation ohne AGE. Die Zellen der Kontroll-IgG-Gruppe dagegen waren morphologisch vergleichbar mit den AGE und Zytokin-stimulierten Monozyten.

4.4 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit aufgeworfenen Fragestellungen geben Raum für weiterführende Untersuchungen. Die Messung der Überstände ergab S100A8/A9-Konzentrationen, die nahe dem Detektionslimit des ELISA-Kits lagen. Ein veränderter Versuchsaufbau könnte Untersuchungen zur Sekretion des Heterodimers oder eben anderer Formierungen aus S100A8 und S100A9 erleichtern. Denkbar sind Versuche mit höherer Zelldichte oder im Anschluss durchgeführter Überstandskonzentrierung. Versuche mit längerer Inkubationszeit könnten die Hypothese der später einsetzenden Sekretion des Heterodimers bestätigen.

Attraktiv im Hinblick auf klinische Aspekte erscheint natürlich eine Blockade von S100A8/S100A9. Dies wirft jedoch die Frage auf, welche Rolle S100A8 und S100A9 nun letztlich wirklich in der Inflammation spielen. Wie einleitend bereits erwähnt, scheint das Heterodimer einerseits nicht zwingend notwendig zu sein, beispielsweise für die murine myeloische Zellantwort (Hobbs et al., 2003). Andererseits wurde die ursächliche Beteiligung etwa an der Neutrophilenrekrutierung gezeigt, auch hier am Mausmodell (Vandal et al., 2003). Möglicherweise ist die Rolle von S100A8/A9 also eher in der Verstärkung dieser Prozesse zu sehen oder es gibt Alternativwege, um das Fehlen von

S100A8/A9 zu kompensieren. Unterschiede zwischen den Funktionen am humanen und am Tiermodell sind natürlich ebenfalls denkbar. Dass S100A8/S100A9, außer mit RAGE, zum Beispiel mit Heparansulfat Glykosaminoglykanen und dem Scavenger Rezeptor CD36 interagieren, ist bereits bekannt (Robinson et al., 2002; Kerkhoff et al., 2001). Es bleibt aber noch zu klären, welche Rezeptoren in vivo durch diese beiden proinflammatorischen Proteine zusätzlich angesteuert werden und ob hiermit weitere Interaktionen aufgeklärt werden können.

Es scheint ferner notwendig, die physikochemischen Bedingungen für die AGE-Rezeptor-Bindung genauer zu verstehen. In der Literatur finden sich diesbezüglich sogar Zweifel, ob die AGE-/RAGE-Interaktionen bei der proinflammatorischen Zellaktivierung überhaupt eine Rolle spielen (Valencia et al., 2004). Bisher wurden zwar überwiegend schädliche Effekte durch RAGE beschrieben, jedoch ist es sehr wahrscheinlich, dass durch den Rezeptor auch physiologische Funktionen erfüllt werden. Das RAGE-abhängige Auswachsen von Axonen kann als Bespiel für solch eine physiologische Aufgabe des Rezeptors genannt werden. Versuche mit RAGE-/-Mäusen könnten hier weitere physiologische Funktionen ans Licht bringen (Huttunen et al., 2000; Baynes et al., 1999).

Die Hochregulierung des RAGE konnte in dieser Arbeit nicht endgültig geklärt werden. Dies liegt wahrscheinlich, wie von Vlassara beschrieben, an der noch unvollständigen Einteilung der AGE-Rezeptoren. AGE-Rezeptoren auf der Zelloberfläche scheinen zu sein: AGE-R1, AGE-R2, AGE-R3 (Galectin-3), RAGE und Scavenger Rezeptoren I und II, weitere AGE-bindende Proteine sind im Zytoplasma lokalisiert (Thornalley, 1998; Vlassara 2001). Notwendig ist ein Abgleich der in klinischen Blockierversuchen verwendeten „RAGE“-Antikörper mit den von ihnen angesteuerten AGE-Rezeptoren. Erst so wird es möglich, von den jeweiligen Versuchsergebnissen auf den exakten Rezeptortyp und dessen Hochregulierungsmechanismus zu schließen.

Prinzipiell müsste eine Gabe von löslichem RAGE (sRAGE) zu ähnlicher Inhibition der hier gezeigten AGE/RAGE-Wirkung führen wie die Blockade durch den RAGE-AK. Wie beschrieben, stellt der lösliche und sezernierte RAGE eine Splice-Variante dar. Er besitzt keine intrazelluläre Domäne und kann daher keine Signaltransduktion induzieren (Malherbe et al., 1999). Hier werden zirkulierende AGEs gebunden, bevor sie eine RAGE-Hochregulierung induzieren. Es wurde bereits nachgewiesen, dass sRAGE-Konzentrationen beim Menschen mit inflammatorischen Markern assoziiert sind, zum

Beispiel zeigten sie sich negativ korreliert mit IL-6-Spiegeln. Weiterhin fanden sich die vorhandenen sRAGE-Level invers korreliert mit kardiovaskulären Risikofaktoren wie Hypertonie und Adipositas. Gesunde Testpersonen wiesen also mehr sRAGEs auf (Choi et al., 2008). Eine Prävention entzündlicher Gefäßerkrankungen konnte unter Einsatz von sRAGE am Tiermodell bereits gezeigt werden (Park et al., 1998; Bucciarelli et al., 2002). Auch wurde hierdurch eine verminderte AGE-Last im Gewebe nachgewiesen. Suzuki et al. sprechen sogar von der Möglichkeit, dass AGE-sRAGE-Komplexe zur Unterdrückung der AGE-Formierung oder verstärkter AGE-Clearance führen können (Suzuki et al., 1997).

Nähere Untersuchungen zu den Mechanismen der AGE-Synthese werden ebenfalls notwendig sein. So werden AGEs bekanntermaßen nicht nur unter diabetischen Bedingungen gebildet, sondern Oxidation allein kann zur AGE-Formation führen und auch Zigarettenrauchen stellt eine exogene Möglichkeit ihrer Genese dar (Cerami et al., 1997). Wenn sich also lokale Redoxpotenziale in Richtung oxidativen Stress verschieben, beispielsweise an Orten der Inflammation, wird die AGE-Synthese gefördert. Da die meisten AGEs irreversible Endprodukte darstellen, kann ihre Akkumulation als eine Art Langzeitgedächtnis zurückliegender Störungen angesehen werden (Baynes, 1991; Schmidt et al., 1999). Zeigt sich, dass eine Potenzierung bei der AGE-Formierung und Akkumulation stattfindet, wären präventive Maßnahmen zur Verhinderung der verstärkten AGE-Last von noch entscheidenderer Bedeutung für den Patienten. Eine Elimination dieser Glykierungsprodukte kann durch sogenannte AGE-Breaker unterstützt werden (Vasan et al., 2003). Parallel dazu erscheint jedoch vor allem bedeutungsvoll, wie der positive Feedback-Mechanismus der RAGE-Liganden-Interaktion physiologischerweise unterbrochen wird und ob hier therapeutisch unterstützend eingegriffen werden kann.

Die Beobachtungen dieser Arbeit fügen sich insgesamt in bereits beschriebene Modelle bezüglich S100A8/S100A9 und den AGE/RAGE-Interaktionen ein. So wurde bereits postuliert, dass S100A8 und S100A9 eine neue Klasse früher Zytokine repräsentieren könnten, die in die angeborene Immunantwort involviert sind (Vandal et al., 2003). In jedem Fall konnte im Rahmen dieser experimentellen Untersuchungen das Bild einer potenziell ausschlaggebenden Beteiligung von S100A8/A9 an entzündlichen Prozessen aufrechterhalten werden. Die signifikanten Expressionssteigerungen von S100A8 und

S100A9 unter inflammatorischen Bedingungen weisen den beiden Proteinen dabei auch eine potenzielle Markerrolle zu.

Auch die Hypothese einer RAGE-Aktivierung im Rahmen der entzündlichen Pathogenese der Atherosklerose wird durch die vorliegenden Ergebnisse unterstützt. Es scheinen folglich S100A8 und S100A9 über RAGE direkt am eigenen positiven Feedback-Mechanismus beteiligt zu sein. Schließlich konnten die AGEs in dem Blockierversuch zunächst binden und die RAGE-Hochregulierung fand statt. Die wirkungsvolle Blockade des Rezeptors spricht daher für eine Bindung von S100A8/A9 am RAGE, der sich ein positiver Verstärkungseffekt anschließt. Zusammenfassend stellen damit RAGE und die zugehörigen AGE/RAGE-Interaktionen ein sich lohnendes therapeutisches Target dar. Allerdings wurde auch deutlich, dass es nicht genügt, allein RAGE als den Rezeptor für AGE zu betrachten. Hier gilt es, weiterführende Untersuchungen anzustellen und die klinische Relevanz dieser Beobachtungen zu erkennen und zu nutzen.

5 Zusammenfassung

Um Wechselwirkungen zwischen proinflammatorischen S100-Proteinen, Zytokinen und AGEs aufzuzeigen, wurden in dieser Arbeit die Expressionsmechanismen für S100A8/S100A9 und ICAM-1 sowie das RAGE-Verhalten am Modell der Monozytenzelllinie THP-1 untersucht. Die Stimulation der Zellkultur mit IL-6 und TNFα bewirkte eine verstärkte mRNA-Expression von S100A8 und S100A9. AGEs führten zur Hochregulierung des RAGE in den THP-1 Zellen und nur in Kombination mit einem anschließenden Zytokinstimulus auch zu einer Vervielfachung der S100A8/A9-Expression und -Sekretion. Die Expression lag etwa achtmal höher als bei alleiniger IL-6/TNFα-Stimulation. Die ICAM-1 Expression wurde ebenfalls durch IL-6 und TNFα stimuliert und durch AGEs nochmals gesteigert. Des Weiteren wurden morphologische Veränderungen der THP-1 Monozyten festgestellt, besonders bei kombinierter Gabe von AGE und TNFα.

Ein RAGE-AK verhinderte dagegen die durch AGE-Vorinkubation vervielfachte S100A8/A9-Expression und -Sekretion. Weiterhin wurde auch das Ausbleiben der AGE-induzierten ICAM-1-Expressionssteigerung und der Zellveränderungen durch die RAGE-Blockade beobachtet. Die erfolgreiche Inhibition des AGE-Effektes durch den Antikörper macht eine ursächliche Beteiligung des RAGE bei der gesteigerten Synthese von S100A8/S100A9 wahrscheinlich. Die vorliegenden Resultate sprechen weiterhin für eine Aktivierung der Monozyten durch proinflammatorische Zytokine und AGEs. Die morphologischen Veränderungen deuten möglicherweise auf eine beginnende Differenzierung der Monozyten hin.

Zusammenfassend unterstützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Hypothese, dass die beiden Proteine S100A8 und S100A9 am Inflammationsgeschehen beteiligt sind und durch akkumulierte AGEs eine Verstärkung der Aktivierungsprozesse stattfinden kann. Weiterhin zeigt die erfolgreich durchgeführte RAGE-Blockade einen klinischen Ansatzpunkt auf. S100A8/S100A9, AGE und der von ihnen angesteuerte RAGE könnten so in Zukunft eine bedeutende Rolle in der Bekämpfung der Atherosklerose und seiner Komplikationen spielen.

Literaturverzeichnis

Ahmed N, Thornalley PJ.
Advanced glycation endproducts: what is their relevance to diabetic complications? Diabetes Obes Metab. 2007;9(3):233-45.

Aronson D, Rayfield EJ.
How hyperglycemia promotes atherosclerosis: molecular mechanisms. Cardiovasc Diabetol. 2002;1:1.

Barthe C, Figarella C, Carrère J, Guy-Crotte O.
Identification of cystic fibrosis protein as a complex of two calcium-binding proteins present in human cells of myeloid origin. Biochim Biophys Acta. 1991;1096(2):175-7.

Basta G, Lazzerini G, Massaro M, et al.
Advanced glycation end products activate endothelium through signal-transduction receptor RAGE: a mechanism for amplification of inflammatory responses. Circulation. 2002;105(7):816-22.

Baynes JW, Thorpe SR.
Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. Diabetes. 1999;48(1):1-9.

Baynes JW.
Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. Diabetes. 1991;40(4):405-12.

Beach KW, Brunzell JD, Strandness DE Jr.
Prevalence of severe arteriosclerosis obliterans in patients with diabetes mellitus. Relation to smoking and form of therapy. Arteriosclerosis. 1982;2(4):275-80.

Beach KW, Strandness DE Jr.
Arteriosclerosis obliterans and associated risk factors in insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes. Diabetes. 1980;29(11):882-8.

Beckman JA, Creager MA, Libby P.
Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. JAMA. 2002;287(19):2570-81.

Berntzen HB, Fagerhol MK, Ostensen M, Mowinckel P, Høyeraal HM.
The L1 protein as a new indicator of inflammatory activity in patients with juvenile rheumatoid arthritis. J Rheumatol. 1991;18(1):133-8.

Bierhaus A, Schiekofer S, Schwaninger M, et al.
Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. Diabetes. 2001;50(12):2792-808.

Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, Nawroth PP.
AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. Cardiovasc Res. 1998;37(3):586-600.

Bierhaus A, Illmer T, Kasper M, et al.
Advanced glycation end product (AGE)-mediated induction of tissue factor in cultured endothelial cells is dependent on RAGE. Circulation. 1997;96(7):2262-71.

Brett J, Schmidt AM, Yan SD, et al.
Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. Am J Pathol. 1993;143(6):1699-712.

Bucciarelli LG, Wendt T, Qu W, et al.
RAGE blockade stabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice. Circulation. 2002;106(22):2827-35.

Burke AP, Kolodgie FD, Zieske A, et al.
Morphologic findings of coronary atherosclerotic plaques in diabetics: a postmortem study. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004;24(7):1266-71.

Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B.
An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1975;72(9):3666-70.

Cerami C, Founds H, Nicholl I, et al.
Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(25):13915-20.

Chavakis T, Bierhaus A, Al-Fakhri N, et al.
The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment. J Exp Med. 2003;198(10):1507-15.

Choi KM, Yoo HJ, Kim HY, et al.
Association between endogenous secretory RAGE, inflammatory markers and arterial stiffness. Int J Cardiol. 2008 [Epub ahead of print].

Crowther MA.
Pathogenesis of atherosclerosis. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2005:436-41.

Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A.
Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. Trends Immunol. 2004;25(1):4-7.

Ding Y, Kantarci A, Hasturk H, Trackman PC, Malabanan A, Van Dyke TE.
Activation of RAGE induces elevated O2- generation by mononuclear phagocytes in diabetes. J Leukoc Biol. 2007;81(2):520-7.

Donato R.
Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. Microsc Res Tech. 2003;60(6):540-51.

Donato R.
Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. Biochim Biophys Acta. 1999;1450(3):191-231.

Drohat AC, Baldisseri DM, Rustandi RR, Weber DJ.
Solution structure of calcium-bound rat S100B as determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. Biochemistry. 1998;37(9):2729-40.

Ehlermann P, Eggers K, Bierhaus A, et al.
Increased proinflammatory endothelial response to S100A8/A9 after preactivation through advanced glycation end products. Cardiovasc Diabetol. 2006;5:6.

Eue I, Pietz B, Storck J, Klempt M, Sorg C.
Transendothelial migration of 27E10+ human monocytes. Int Immunol. 2000;12(11):1593-604.

Fernández-Real JM, Ricart W.
Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. Endocr Rev. 2003;24(3):278-301.

Figarola JL, Shanmugam N, Natarajan R, Rahbar S.
Anti-inflammatory effects of the advanced glycation end product inhibitor LR-90 in human monocytes. Diabetes. 2007;56(3):647-55.

Fiorillo MT, Cabibbo A, Iacopetti P, Fattori E, Ciliberto G.
Analysis of human/mouse interleukin-6 hybrid proteins: both amino and carboxy termini of human interleukin-6 are required for in vitro receptor binding. Eur J Immunol. 1992;22(10):2609-15.

Foell D, Frosch M, Sorg C, Roth J.
Phagocyte-specific calcium-binding S100 proteins as clinical laboratory markers of inflammation. Clin Chim Acta. 2004;344(1-2):37-51.

Frosch M, Strey A, Vogl T, Wulffraat NM, Kuis W, Sunderkötter C et al.
Myeloid-related proteins 8 and 14 are specifically secreted during interaction of phagocytes and activated endothelium and are useful markers for monitoring disease activity in pauciarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2000;43(3):628-37.

Goebeler M, Roth J, Kunz M, Sorg C.
Expression of intercellular adhesion molecule-1 by murine macrophages is up-regulated during differentiation and inflammatory activation. Immunobiology. 1993;188(1-2):159-71.

Haga HJ, Brun JG, Berntzen HB, Cervera R, Khamashta M, Hughes GR.
Calprotectin in patients with systemic lupus erythematosus: relation to clinical and laboratory parameters of disease activity. Lupus. 1993;2(1):47-50.

Hasegawa T, Kosaki A, Kimura T, et al.
The regulation of EN-RAGE (S100A12) gene expression in human THP-1 macrophages. Atherosclerosis. 2003;171(2):211-8.

Hehlgans T, Pfeffer K.
The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. Immunology. 2005;115(1):1–20.

Hermani A, De Servi B, Medunjanin S, Tessier PA, Mayer D.
S100A8 and S100A9 activate MAP kinase and NF-kappaB signaling pathways and trigger translocation of RAGE in human prostate cancer cells. Exp Cell Res. 2006;312(2):184-97.

Hessian PA, Edgeworth J, Hogg N.
MRP-8 and MRP-14, two abundant Ca(2+)-binding proteins of neutrophils and monocytes. J Leukoc Biol. 1993;53(2):197-204.

Hobbs JA, May R, Tanousis K, et al.
Myeloid cell function in MRP-14 (S100A9) null mice. Mol Cell Biol. 2003;23(7):2564-76.

Hofmann MA, Drury S, Fu C, et al.
RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. Cell. 1999;97(7):889-901.

Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM.
Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. J Clin Invest. 1995;95(5):2409-15.

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM.
Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. Science. 1993;259(5091):87-91.

Hu FB, Stampfer MJ.
Is type 2 diabetes mellitus a vascular condition? Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003;23(10):1715-6.

Hunt KJ, Williams K, Rivera D, et al.
Elevated carotid artery intima-media thickness levels in individuals who subsequently develop type 2 diabetes. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003;23(10):1845-50.

Huttunen HJ, Kuja-Panula J, Sorci G, Agneletti AL, Donato R, Rauvala H.
Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphoterin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. J Biol Chem. 2000;275(51):40096-105.

Isoda K, Folco E, Marwali MR, Ohsuzu F, Libby P.
Glycated LDL increases monocyte CC chemokine receptor 2 expression and monocyte chemoattractant protein-1-mediated chemotaxis. Atherosclerosis. 2008;198(2):307-12.

Kerkhoff C, Sorg C, Tandon NN, Nacken W.
Interaction of S100A8/S100A9-arachidonic acid complexes with the scavenger receptor CD36 may facilitate fatty acid uptake by endothelial cells. Biochemistry 2001;40(1):241–8.

Kerkhoff C, Klempt M, Kaever V, Sorg C.
The two calcium-binding proteins, S100A8 and S100A9, are involved in the metabolism of arachidonic acid in human neutrophils. J Biol Chem. 1999;274(46):32672-9.

Kislinger T, Tanji N, Wendt T, et al.
Receptor for advanced glycation end products mediates inflammation and enhanced expression of tissue factor in vasculature of diabetic apolipoprotein E-null mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001;21(6):905-10.

Lackmann M, Rajasekariah P, Iismaa SE, et al.
Identification of a chemotactic domain of the pro-inflammatory S100 protein CP-10. J Immunol. 1993;150(7):2981-91.

Lander HM, Tauras JM, Ogiste JS, Hori O, Moss RA, Schmidt AM.
Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21(ras)-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress. J Biol Chem. 1997;272(28):17810-4.

Lau W, Devery JM, Geczy CL.
A chemotactic S100 peptide enhances scavenger receptor and Mac-1 expression and cholesteryl ester accumulation in murine peritoneal macrophages in vivo. J Clin Invest 1995;95:1957-1965.

Li J, Schmidt AM.
Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. J Biol Chem. 1997;272(26):16498-506.

Libby P, Clinton SK.
Cytokines as mediators of vascular pathology. Nouv Rev Fr Hematol. 1992;34:47-53.

Makita Z, Vlassara H, Cerami A, Bucala R.
Immunochemical detection of advanced glycosylation end products in vivo. J Biol Chem. 1992;267(8):5133-8.

Malherbe P, Richards JG, Gaillard H, et al.
cDNA cloning of a novel secreted isoform of the human receptor for advanced glycation end products and characterization of cells co-expressing cell-surface scavenger receptors and Swedish mutant amyloid precursor protein. Brain Res Mol Brain Res. 1999;71(2):159-70.

Malizia G, Calabrese A, Cottone M, et al.
Expression of leukocyte adhesion molecules by mucosal mononuclear phagocytes in inflammatory bowel disease. Gastroenterology. 1991;100(1):150-9.

Matsumoto A, Naito M, Itakura H, et al.
Human macrophage scavenger receptors: primary structure, expression, and localization in atherosclerotic lesions. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990;87(23):9133-7.

McCormick MM, Rahimi F, Bobryshev YV, et al.
S100A8 and S100A9 in human arterial wall. Implications for atherogenesis. J Biol Chem. 2005;280(50):41521-9.

Munro JM, Cotran RS.
The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation. Lab Invest. 1988;58(3):249-61.

Nacken W, Kerkhoff C.
The hetero-oligomeric complex of the S100A8/S100A9 protein is extremely protease resistant. FEBS Lett. 2007;581(26):5127-30.

Neeper M, Schmidt AM, Brett J, et al.
Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. J Biol Chem. 1992;267(21):14998-5004.

Newton RA, Hogg N.
The human S100 protein MRP-14 is a novel activator of the beta 2 integrin Mac-1 on neutrophils. J Immunol. 1998;160(3):1427-35.

Oakley BR, Kirsch DR, Morris NR.
A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. Anal Biochem. 1980;105(2):361-3.

Odink K, Cerletti N, Brüggen J, et al.
Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis. Nature. 1987;330(6143):80-2.

Park L, Raman KG, Lee KJ, et al.
Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. Nat Med. 1998;4(9):1025-31.

Pechkovsky DV, Zalutskaya OM, Ivanov GI, Misuno NI.
Calprotectin (MRP8/14 protein complex) release during mycobacterial infection in vitro and in vivo. FEMS Immunol Med Microbiol. 2000;29(1):27-33.

Pertyńska-Marczewska M, Kiriakidis S, Wait R, Beech J, Feldmann M, Paleolog EM.
Advanced glycation end products upregulate angiogenic and pro-inflammatory cytokine production in human monocyte/macrophages. Cytokine. 2004;28(1):35-47.

Pyörälä K, Laakso M, Uusitupa M.
Diabetes and atherosclerosis: an epidemiologic view. Diabetes Metab Rev. 1987;3(2):463-524.

Rammes A, Roth J, Goebeler M, Klempt M, Hartmann M, Sorg C.
Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium-binding proteins of the S100 family, are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent pathway. J Biol Chem. 1997;272(14):9496-502.

Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N.
C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. N Engl J Med. 2000;342(12):836-43.

Robinson MJ, Tessier P, Poulsom R, Hogg N.
The S100 family heterodimer, MRP-8/14, binds with high affinity to heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans on endothelial cells. J Biol Chem 2002;277(5):3658–65.

Rönnemaa T, Laakso M, Puukka P, Kallio V, Pyörälä K.
Atherosclerotic vascular disease in middle-aged, insulin-treated, diabetic patients. Association with endogenous insulin secretion capacity. Arteriosclerosis. 1988;8(3):237-44.

Ross R.
Atherosclerosis - an inflammatory disease. N Engl J Med. 1999;340(2):115-26.

Roth J, Teigelkamp S, Wilke M, Grün L, Tümmler B, Sorg C.
Complex pattern of the myelo-monocytic differentiation antigens MRP8 and MRP14 during chronic airway inflammation. Immunobiology. 1992;186(3-4):304-14.

Rouhiainen A, Kuja-Panula J, Wilkman E, et al.
Regulation of monocyte migration by amphoterin (HMGB1). Blood. 2004;104(4):1174-82.

Ruan H, Lodish HF.
Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor-alpha. Cytokine Growth Factor Rev. 2003;14(5):447-55.

Ruan H, Hacohen N, Golub TR, Van Parijs L, Lodish HF.
Tumor necrosis factor-alpha suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor-kappaB activation by TNF-alpha is obligatory. Diabetes. 2002;51(5):1319-36.

Saadeddin SM, Habbab MA, Ferns GA.
Markers of inflammation and coronary artery disease. Med Sci Monit. 2002;8(1):RA5-12.

Sampson MJ, Davies IR, Brown JC, Ivory K, Hughes DA.
Monocyte and neutrophil adhesion molecule expression during acute hyperglycemia and after antioxidant treatment in type 2 diabetes and control patients. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002;22(7):1187-93.

Santamaria-Kisiel L, Rintala-Dempsey AC, Shaw GS.
Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family. Biochem J. 2006;396(2):201-14.

Schafer BW, Heizmann CW.
The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. Trends Biochem Sci. 1996;21(4):134-40.

Schafer BW, Wicki R, Engelkamp D, Mattei MG and Heizmann CW.
Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: rationale for a new nomenclature of the S100 calcium- binding protein family. Genomics 1995;25(3):638-43.

Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM.
The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. J Clin Invest. 2001;108(7):949-55.

Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM.
The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands. Biochim Biophys Acta. 2000;1498(2-3):99-111.

Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern D.
Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. Circ Res. 1999;84(5):489-97.

Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M, et al.
Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. J Biol Chem. 1992;267(21):14987-97.

Siegenthaler G, Roulin K, Chatellard-Gruaz D, et al.
A heterocomplex formed by the calcium-binding proteins MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9) binds unsaturated fatty acids with high affinity. J Biol Chem. 1997;272(14):9371-7.

Sjöholm A, Nyström T.
Endothelial inflammation in insulin resistance. Lancet. 2005;365(9459):610-2.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al.
Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem. 1985;150(1):76-85.

Sorci G, Riuzzi F, Agneletti AL, Marchetti C, Donato R.
S100B causes apoptosis in a myoblast cell line in a RAGE-independent manner. J Cell Physiol. 2004;199(2):274-83.

Spranger J, Kroke A, Möhlig M, et al.
Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. Diabetes. 2003;52(3):812-7.

Stehouwer CD, Gall MA, Twisk JW, Knudsen E, Emeis JJ, Parving HH.
Increased urinary albumin excretion, endothelial dysfunction, and chronic low-grade inflammation in type 2 diabetes: progressive, interrelated, and independently associated with risk of death. Diabetes. 2002;51(4):1157-65.

Stern MP.
Diabetes and cardiovascular disease. The "common soil" hypothesis. Diabetes. 1995;44(4):369-74.

Stout RW.
Insulin and atheroma. 20-yr perspective. Diabetes Care. 1990;13(6):631-54.

Strasser F, Gowland PL, Ruef C.
Elevated serum macrophage inhibitory factor-related protein (MRP) 8/14 levels in advanced HIV infection and during disease exacerbation. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol. 1997;16(4):230-8.

Takata K, Horiuchi S, Araki N, Shiga M, Saitoh M, Morino Y.
Endocytic uptake of nonenzymatically glycosylated proteins is mediated by a scavenger receptor for aldehyde-modified proteins. J Biol Chem. 1988;263(29):14819-25.

Tan AL, Forbes JM, Cooper ME.
AGE, RAGE, and ROS in diabetic nephropathy. Semin Nephrol. 2007;27(2):130-43.

Thornalley PJ, Battah S, Ahmed N, et al.
Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. Biochem J. 2003;375(Pt 3):581-92.

Thornalley PJ.
Cell activation by glycated proteins. AGE receptors, receptor recognition factors and functional classification of AGEs. Cell Mol Biol 1998;44(7):1013-23.

Trayhurn P, Beattie JH.
Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. Proc Nutr Soc. 2001;60(3):329-39.

Treutiger CJ, Mullins GE, Johansson AS, et al.
High mobility group 1 B-box mediates activation of human endothelium. J Intern Med. 2003;254(4):375-85.

Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K.
Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). Int J Cancer. 1980;26(2):171-6.

Valencia JV, Mone M, Koehne C, Rediske J, Hughes TE.
Binding of receptor for advanced glycation end products (RAGE) ligands is not sufficient to induce inflammatory signals: lack of activity of endotoxin-free albumin-derived advanced glycation end products. Diabetologia. 2004;47(5):844-52.

Vandal K, Rouleau P, Boivin A, Ryckman C, Talbot M, Tessier PA.
Blockade of S100A8 and S100A9 suppresses neutrophil migration in response to lipopolysaccharide. J Immunol. 2003;171(5):2602-9.

Vasan S, Foiles P, Founds H.
Therapeutic potential of breakers of advanced glycation end product-protein crosslinks. Arch Biochem Biophys. 2003;419(1):89-96.

Verma S, Yeh ET.
C-reactive protein and atherothrombosis--beyond a biomarker: an actual partaker of lesion formation. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2003;285(5):R1253-6.

Visseren FL, Bouwman JJ, Bouter KP, et al.
Procoagulant activity of endothelial cells after infection with respiratory viruses. Thromb Haemost. 2000;84(2):319-24.

Vlassara H.
The AGE-receptor in the pathogenesis of diabetic complications. Diabetes Metab Res Rev. 2001;17(6):436-43.

WHO Healt Report 2003; Chapter 6: Neglected Global Epidemics
http://www.who.int/whr/2003/chapter6/en/index1.html (abgerufen am 02.06.2008).

Xu K, Yen T, Geczy CL.
Il-10 up-regulates macrophage expression of the S100 protein S100A8. J Immunol. 2001;166(10):6358-66.

Xu K, Geczy CL.
IFN-gamma and TNF regulate macrophage expression of the chemotactic S100 protein S100A8. J Immunol. 2000;164(9):4916-23.

Yamagishi S, Adachi H, Nakamura K, et al.
Positive association between serum levels of advanced glycation end products and the soluble form of receptor for advanced glycation end products in nondiabetic subjects. Metabolism. 2006;55(9):1227-31.

Yeh CH, Sturgis L, Haidacher J, et al.
Requirement for p38 and p44/p42 mitogen-activated protein kinases in RAGE-mediated nuclear factor-kappaB transcriptional activation and cytokine secretion. Diabetes. 2001;50(6):1495-504.

Yong HY, Moon A.
Roles of calcium-binding proteins, S100A8 and S100A9, in invasive phenotype of human gastric cancer cells. Arch Pharm Res. 2007;30(1):75-81.

Zieman SJ, Melenovsky V, Kass DA.
Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005;25(5):932-43.

Zimmet P, Alberti KG, Shaw J.
Global and societal implications of the diabetes epidemic. Nature. 2001;414(6865):782-7.

Zwadlo G, Brüggen J, Gerhards G, Schlegel R, Sorg C.
Two calcium-binding proteins associated with specific stages of myeloid cell differentiation are expressed by subsets of macrophages in inflammatory tissues.Clin Exp Immunol. 1988;72(3):510-5.

Danksagung

An erster Stelle danke ich Frau Prof. Dr. med. Verena Stangl für die freundliche Überlassung des interessanten Promotionsthemas und die daraus resultierende Möglichkeit, wissenschaftlich und experimentell forschend tätig zu werden. Mein besonderer Dank gilt Dr. med. Kai Eggers für die Heranführung an die Thematik, die engagierte Betreuung, Unterstützung und Motivation bei der Durchführung des Projektes, sowie die kritische und konstruktive Durchsicht des Manuskriptes.

Herzlich danke ich auch Dr. Mario Lorenz und den medizin-technischen Assistentinnen des Kardiologischen Forschungslabors, insbesondere Angelika Westphal und Minoo Moobed, für die sachkundige Einarbeitung in die Laborarbeit, die stets offenen Ohren für Fragen und die ausnahmslos gute Arbeitsatmosphäre.

Ohne die moralische Unterstützung meiner Familie und Freunde hätte ich diese Arbeit nicht durchführen können. Daher gilt ihnen mein größter Dank, auch für die Hilfsbereitschaft beim gewissenhaften Korrekturlesen. Besonders danke ich dabei meinen Eltern, die mich in jeder Hinsicht und zu jeder Zeit liebevoll unterstützten und meinem Freund Georg Lasar für seine Geduld, unermüdlichen Beistand und die unzähligen aufbauenden Worte.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Erklärung

Ich, Kristin Sikora, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „RAGE-abhängige S100A8- und S100A9-Expression in humanen THP-1 Zellen" selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum Unterschrift