

Aus der Medizinischen Klinik II
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. H. Schunkert

S100A8/S100A9 abhängige Aktivierung
der RAGE/MAPK/NF- κ B
Signaltransduktionssequenz:
Ein neues Modell der chronischen Inflammation
am humanen Endothel

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Kai Eggers
aus Berlin

Lübeck 2003

1. Berichterstatter: PD Dr. med. A. Remppis

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Schunkert

Tag der mündlichen Prüfung: 20.08.2004

Zum Druck genehmigt, Lübeck, den 20.08.2004

Gez.: Prof. Dr. P. Dominiak

-Dekan der Medizinischen Fakultät-

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Atherosklerose ist eine entzündliche Erkrankung	5
1.2	Rolle von <i>Advanced Glycation End-Products</i> und ihres Rezeptors RAGE....	6
1.3	Der Rezeptor RAGE und seine nachgeschaltete Signaltransduktion.....	7
1.4	Die " <i>Two Hit</i> "-Theorie.....	7
1.5	S100 Proteine	9
1.6	Die Calgranuline S100A8 und S100A9	12
1.7	Fragestellung	14
2	Materialien	15
2.1	Geräte	15
2.2	Laborbedarf.....	16
2.3	Reagenzien.....	16
3	Methoden	18
3.1	Proteinsynthese.....	18
3.1.1	AGE Synthese.....	18
3.1.2	Herstellung des Heterodimers aus S100A8 und S100A9	18
3.2	Zellkultur.....	19
3.2.1	Endothelzellpräparation und Kulturbedingungen	19
3.2.2	Passagierung der Kulturen.....	20
3.2.3	Stimulationsversuche	21
3.2.4	Inhibitionsversuche	22
3.3	Analytik.....	22
3.3.1	<i>One Stage Clotting Assay</i> zum Nachweis der prokoagulatorischen Aktivität an der Endothelzelloberfläche	22
3.3.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung.....	23
3.3.3	Aufarbeitung von zytoplasmatischen Proteinfractionen	23
3.3.4	Western-Blot für RAGE	24
3.3.5	Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen.....	25
3.3.6	Extraktion von Zellkernproteinen.....	27
3.3.7	NF- κ B p65 ELISA.....	29
3.3.8	sonstige ELISA.....	32

3.3.9 Statistik.....	32
4 Ergebnisse	33
4.1 Prokoagulatorische Aktivierung von HUVEC unter AGE.....	33
4.2 Vermehrte RAGE Expression unter AGE	33
4.3 RAGE / S100A8/S100A9 Interaktion	34
4.4 Effekte in Abhängigkeit von der Heterodimerform von S100A8 & S100A9..	35
4.4.1 Dosis-Wirkungs-Beziehung von S100A8/S100A9	36
4.4.2 Signaltransduktionswege unter S100A8/S100A9, RAGE und NF- κ B.....	37
4.4.3 MAP Kinasen Aktivierung unter AGE / S100A8/A9.....	38
4.4.4 NF- κ B unter S100A8/S100A9	39
5 Diskussion.....	40
5.1 Effekte von AGE an humanen Endothelzellen	41
5.2 Effekte von S100A8/S100A9 in Abhängigkeit einer AGE-Vorstimulation.....	41
5.3 AGE-unabhängige Effekte von S100A8/S100A9	44
5.4 Effekte von Statinen	46
6 Zusammenfassung	48
7 Abkürzungsverzeichnis.....	49
8 Literatur	51
9 Danksagung	61
10 Lebenslauf.....	62

1 Einleitung

1.1 Atherosklerose ist eine entzündliche Erkrankung

Atherosklerose wird in jüngerer Zeit zunehmend als entzündliche Erkrankung verstanden (Ross, 1999), deren Pathomechanismus weit über die bloße Einlagerung von LDL-Cholesterin in die Gefäßwand hinausgeht. Typische zelluläre und molekulare Veränderungen bei Atherosklerose gleichen denen bei anderen chronisch-entzündlichen Erkrankungen. So ist die früheste atherosklerotische Manifestation, das sogenannte "fatty streak", welches bereits in Kinder- und Jugendalter nachgewiesen werden kann, eine typische entzündliche Läsion bestehend aus in Makrophagen transformierten Monozyten und aktivierten T-Lymphozyten (Stary, 1989).

Das entscheidende Ereignis dieses Prozesses stellt hierbei die MCP-1 vermittelte monozytäre Migration dar. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass die Restenoserate und Myokardinfarktgröße sich durch MCP-1 Neutralisation senken lassen (Furukawa et al., 1999). Ferner konnte auch in klinischen Studien ein erhöhter MCP-1 Spiegel bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt nachgewiesen werden (Matsumori et al., 1997). Aber beim akuten Koronarsyndrom finden sich auch erhöhte Spiegel anderer Zytokine. Speziell für IL-6 konnte eine prädiktive Bedeutung für einen späteren Myokardinfarkt beim Gesunden gezeigt werden (Ridker et al., 2000). IL-6 wiederum induziert im Hepatozyten die Freisetzung von CRP, welches mittlerweile ein etablierter Parameter zur Risikostratifizierung von Patienten mit kardio-vaskulären Erkrankungen ist (Ridker et al., 2000).

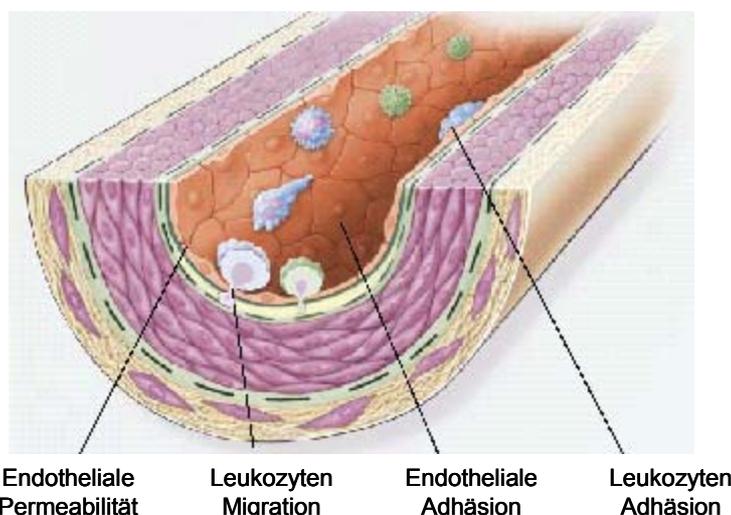


Abbildung 1.1:

Frühe Veränderungen am Endothel mit erhöhter Permeabilität und vermehrter Expression von ICAM-1, VCAM-1 und MCP-1. Es kommt zu einer Leukozyten-adhäsion mit nachfolgender Plaquebildung (Ross, 1999)

1.2 Rolle von *Advanced Glycation End-Products* und ihres Rezeptors RAGE

Bislang ist jedoch für die Atherosklerose, wie auch für andere chronisch inflammatorische Erkrankungen, noch unklar, welche Mechanismen zur Perpetuierung der systemischen Entzündungsreaktionen führen. Bisherige Publikationen legen allerdings nahe, daß glykierte und oxidierte Proteine, sogenannte AGEs ("Advanced Glycation End-Products"), und ihr Rezeptor RAGE ("Receptor of Advanced Glycation End-Products") hierbei eine wesentliche Rolle spielen. Der RAGE-Rezeptor gehört zur Gruppe der Immunglobulin Superfamilie, dessen Gen auf Chromosom 6 zwischen MHC-2 und MHC-3 lokalisiert ist. Als Liganden von RAGE sind neben AGE auch Amphoterin und Amyloid beta identifiziert worden. Letzteres scheint auch eine zentrale Rolle in der Pathogenese des Morbus Alzheimer zu spielen (Yan et al., 1996). Bisher konnten drei Faktoren für die Entstehung von AGE-Proteinen identifiziert werden. Dies sind zum einen rezidivierende Hyperglykämien, zum anderen werden oxidativer Stress und molekulares Turnover für die Entstehung von AGEs verantwortlich gemacht. Ferner werden exogene Faktoren, wie inhalatives Zigarettenrauchen in Betracht gezogen (Cerami et al., 1997). Im Gegensatz zu der reversiblen Glykosylierung des bekannten Laborparameters HbA_{1c} ist diese Reaktion als irreversibel anzusehen. Biochemisch handelt es sich dabei um eine nicht-enzymatische Reaktion reduzierender Zucker, wie z.B. Glucose mit Amino-Gruppen in Proteinen, Lipiden und Nucleinsäuren unter Ausbildung einer Schiff'schen Base (Raj et al., 2000). Eine Akkumulation von AGEs ist bei Diabetes mellitus, chronischer Niereninsuffizienz, Amyloidose, Morbus Alzheimer und letztlich auch bei normalen Alterungsprozessen bekannt (Schmidt et al., 1996). Für AGE-Proteine konnten neben RAGE aber auch verschiedene Rezeptoren, wie zum Beispiel die Makrophagen Scavenger Rezeptoren Typ I und Typ II identifiziert werden. RAGE ist jedoch der am besten charakterisierte Rezeptor für AGE Proteine (Stitt et al., 1999).

An einem Modell akzelerierter Atheroskleroseentstehung (Streptozotocin-induzierter Diabetes in ApoE-Knockout Mäusen) konnte gezeigt werden, daß die Entstehung atherosklerotischer Plaques in der Aorta durch Gabe eines löslichen AGE-Rezeptors (sRAGE) verhindert werden kann (Park et al., 1998). Auch bei bereits etablierter Atherosklerose ist eine RAGE-Blockade effektiv, da sie zu einer Stabilisierung bereits bestehender Plaques führt (Bucciarelli et al., 2002).

1.3 Der Rezeptor RAGE und seine nachgeschaltete Signaltransduktion

Nach Bindung von AGE an RAGE kommt es zur MAP-Kinase-abhängigen Aktivierung von NF κ B, die ihrerseits die Expression von Proteinen begünstigt, die prokoagulatorisch (z.B. tissue factor), proinflammatorisch (IL-1, IL-6, TNF α , Adhäsionsmoleküle, GM-CSF) und vasokonstriktorisch (Endothelin-1) wirken (Kislinger et al., 2001). Im Gegensatz zu vielen anderen Rezeptorsystemen, die nach ihrer Aktivierung einen negativen Feedbackmechanismus induzieren, führt die RAGE-abhängige Stimulation von NF κ B aufgrund positiver Feedback-Mechanismen zu einer Verstärkung und Perpetuierung der RAGE/MAPK/NF κ B Signaltransduktionssequenz. Denn einerseits führt die Aktivierung von NF κ B zu einer vermehrten Expression des Rezeptors für AGE, während andererseits eine Stimulation von RAGE zu einer nachhaltigen Steigerung der Transkription von NF κ B p65 führt (Bierhaus et al., 2001). Ein solcher pathophysiologischer Mechanismus ist vor allem für Patienten mit metabolischem Syndrom, Diabetes mellitus und terminaler Niereninsuffizienz von Bedeutung, die erhöhte Konzentrationen von AGE-Proteinen und häufig eine systemische Atherosklerose aufweisen.

Dieser zellbiologisch sehr grundlegende Signaltransduktionsweg, der im übrigen auch im Rahmen anderer chronisch inflammatorischer Erkrankungen des Bindegewebes und Darmes aktiviert ist und bei der Tumormetastasierung eine wesentliche Rolle spielt (Schmidt et al., 2000), scheint einer komplexen Modulation zu unterliegen, die einem sehr variablen Phänotyp zugrundeliegen könnte. Einerseits ist aufgrund neuester Arbeiten der Gruppe um Grant (Hudson et al., 2001) bekannt, daß Polymorphismen des RAGE Promotors zu einer differentiellen Expression von RAGE unter NF κ B -Stimulation und damit zu einer differentiellen Stimulierbarkeit des gesamten Signaltransduktionsweges führen. Ferner belegen jüngere Arbeiten, daß gleich mehrere Vertreter der Ca²⁺ bindenden S100 Proteinfamilie funktionell in eine RAGE vermittelte Aktivierung der MAP-Kinasen abhängigen Signaltransduktion eingebunden sind (Yeh et al., 2001).

1.4 Die "Two Hit"-Theorie

Neben klassischen RAGE-Liganden, wie Glykierungs- und Oxidationsprodukten, können weitere Faktoren wie modifizierte Lipoproteine, bakterielle Pathogene oder oxidativer Streß eine wichtige Rolle in der Aktivierung der RAGE-assoziierten Signaltransduktion spielen. In diesem Zusammenhang wurde ein "Two-hit model" propagiert (Schmidt et al.,

2000), in welchem nach einer chronischen Präaktivierung durch AGEs ein zweiter "Hit" zu einer überschießenden Inflamationsantwort führt. Dieses "Two Hit"-Theorie geht davon aus, daß es in einem ersten Schritt zunächst zu einer AGE/RAGE Interaktion kommt. Dies ist modellhaft für Erkrankungen wie Diabetes mellitus oder terminale Niereninsuffizienz, in denen es zu einer Überladung des Organismus mit AGEs kommt. In einem zweiten Schritt kommt es durch einen weiteren Stimulus zu einer zellulären Aktivierung, welche entzündliche Veränderungen in atherosklerotischen Läsionen verstärkt (Schmidt et al., 1999). Möglichweise können eine ganze Reihe von Faktoren diesen zweiten Stimulus darstellen, diskutiert werden Lipoproteine, oxidativer Streß und verschiedene proinflammatorische Mediatoren.

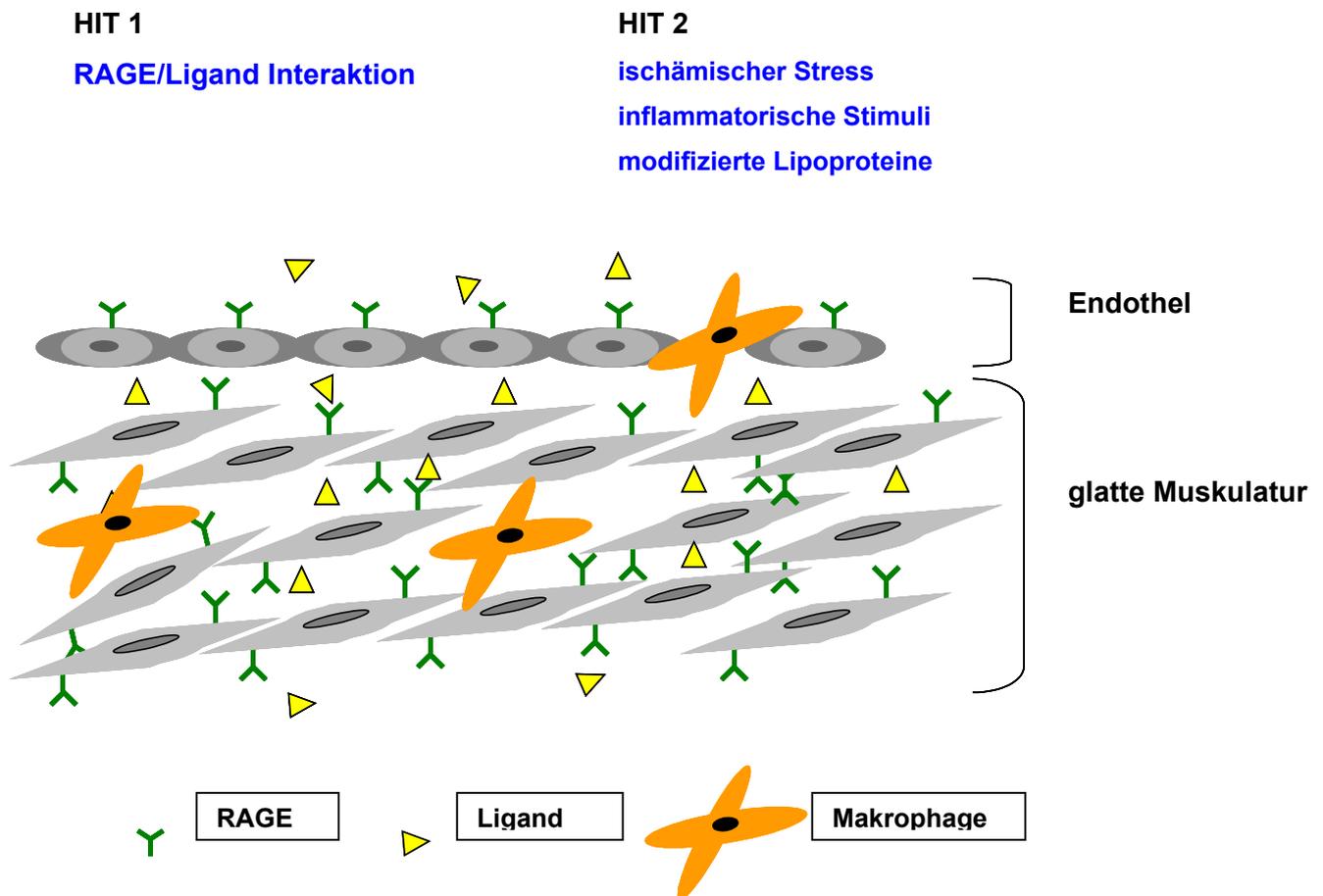


Abbildung 1.2.: Two Hit Theorie nach Schmidt et al 1999

1.5 S100 Proteine

Jüngere Arbeiten belegen, daß nicht nur die klassischen RAGE-Liganden, wie sie die verschiedenen Glykierungs- und Oxidationsprodukte darstellen, in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen, sondern daß auch Proteine der S100-Familie funktionell in eine RAGE vermittelte Aktivierung der MAP-Kinasen abhängigen Signaltransduktion eingebunden sind (Hofmann et al., 1999; Yeh et al., 2001). Derzeit sind etwa 20 verschiedene S100-Proteine bekannt, die alle zur Klasse der kalziumbindenden EF-Hand Proteine zählen. Diese EF-Hand besteht aus zwei α -Helices (E- und F-Helix), welche durch eine kalziumbindende Schleife (Loops) miteinander verbunden sind. Die Koordination des Kalzium innerhalb des Loops wird durch acht O_2 Atome gewährleistet (je drei aus Glutamat- und Aspartatseitenketten und je einem Carbonylsauerstoff der Hauptkette sowie eines Wassermoleküls). Diese als kanonisch bezeichnete Struktur ist charakteristisch für die Klasse der EF-Hand Proteine. Innerhalb der S100-Proteine bildet diese Struktur das C-terminale Ende und zeigt eine Kalziumbindungsaffinität von $k_d=20-50\mu M$. Das N-terminale Ende bildet ein zweiter, nicht kanonischer Loop, welcher mit $k_d=200-500\mu M$ eine wesentlich geringere Kalziumbindungsaffinität zeigt und für die S100 Familie konstitutiv ist. Flankiert werden beide EF-Hände von hydrophoben Domänen, die kalziumabhängig ihre Konformation ändern und dabei hydrophobe Regionen an der Oberfläche des Moleküls exponieren. Diese wiederum interagieren mit hydrophoben Regionen von S100-Zielproteinen. Beide EF-Hände wiederum sind untereinander durch eine Scharnierregion ("*hinge region*") miteinander verbunden. Die Aminosäuresequenz der einzelnen S100-Proteine unterscheidet sich insbesondere im Bereich dieser Scharnierregion.

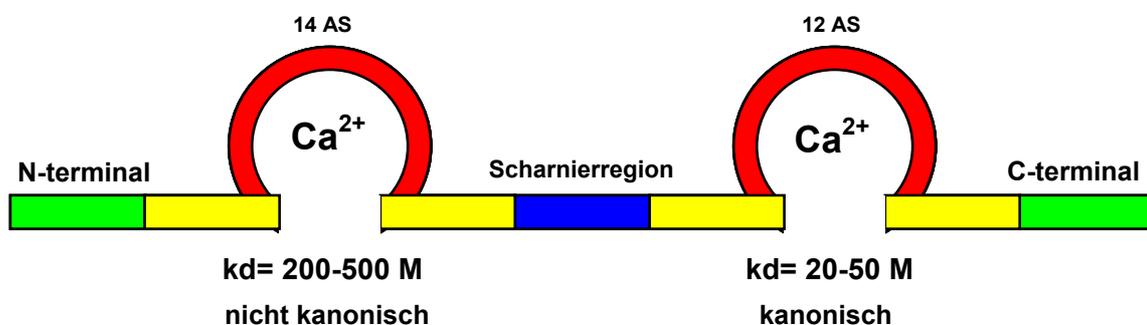


Abbildung 1.3.: Schematische Struktur der S100 Proteine

S100-Proteine sind in verschiedenen Geweben an der Regulation von Zellzyklus, Zelldifferenzierung und verschiedener Signaltransduktionswege beteiligt. Mit Ausnahme weniger (S100B, CALB 3, S100P) sind alle bisher identifizierten S100 Proteine auf einem engen Cluster auf Chromosom 1q21 (450kB) kodiert, so daß sich die neue Nomenklatur an der Lokalisierung der Gene auf diesem Cluster orientiert (Schafer et al., 1995). Für alle Vertreter der S100 Familie gilt, daß ihre Gene eine hoch konservative Struktur aufweisen. Von drei Exons bleibt das erste untranslatiert, die Exons zwei und drei kodieren jeweils für eine EF-Hand. Die Translationsprodukte dieses Genclusters weisen ein Molekulargewicht von 9 bis 13 kDa und eine überwiegend saure Aminosäurezusammensetzung auf. Intrazellulär liegen S100-Proteine als Dimere vor, wobei experimentelle Daten vermuten lassen, daß die Dimerisierung eine Voraussetzung für die vielfältigen physiologischen Funktionen darstellt, die bislang für S100 Proteine diskutiert werden (Barger et al., 1992). Interessanterweise findet man bei verschiedenen metabolischen, chronisch inflammatorischen und neoplastischen Erkrankungen eine differentielle Expression von S100 Proteinen, für die im jeweiligen pathophysiologischen Geschehen eine bedeutende funktionelle Rolle vermutet wird (Schafer und Heizmann, 1996).

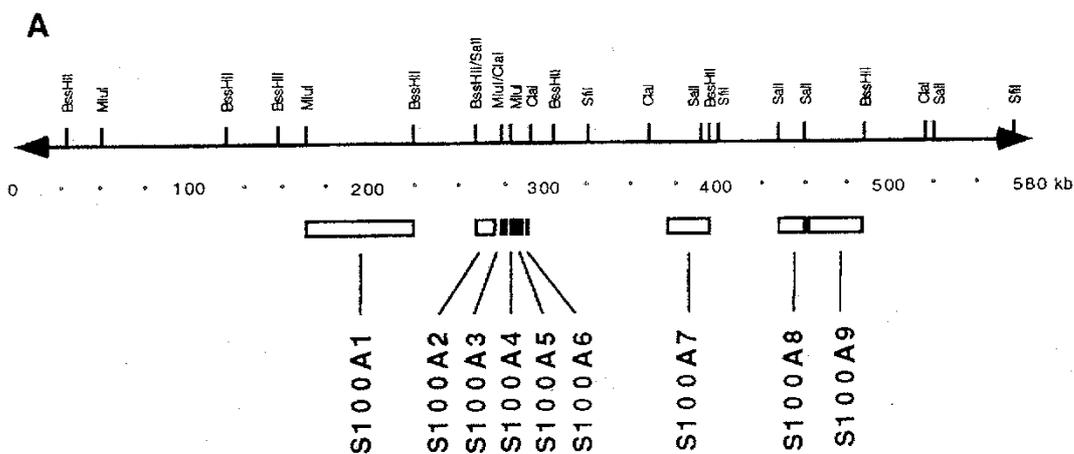


Abbildung 1.4 : Organisation des Genclusters aus S100 Proteinen auf Chromosom 1q21 aus Schafer und Heizmann 1996.

S 100 Protein	Wirkung und Funktion
S100 A1	Regulation der myokardialen Kalziumhomöostase und Kontraktion. Sensitivierung der dünnen Filamente des kontraktiven Apparates für Kalzium. Antiapoptotische Effekte an Kardiomyozyten.
S100 A2	Chemotaktisch für eosinophile Granulozyten, Inhibition der Tumorzellmotilität
S100 A4	Stimulation der Angiogenese, Neuriten-extensions-Aktivität Aktivierung des ERK1/2 Signaltransduktionsweges in Neuronen
S100 A7	Chemotaktisch für CD4 positive Lymphozyten
S100 A8	Das nicht-oxidierte <i>Homodimer S100 A8</i> fungiert als potentes chemotaktisches Agens für Leukozyten In Form des <i>Heterodimers S100 A8/A9</i> proinflammatorische Wirkung und Verstärkung der CD11b Expression in humanen Monocyten, Makrophagen inhibierende Wirkung, verstärkte Immunglobulinsynthese in Lymphozyten Beeinflussung des Arachnoidonsäurestoffwechsels in inflammatorischen Zellen
S100 A9	siehe S100 A8 / Heterodimer S100 A8/A9 Bindung an Heparan-Sulfat
S100 A10	Inhibition der extrinsischen Wegstrecke der Blutgerinnung Bindung an Plasminogen Stimulation der t-Pa abhängigen Plasminogen Aktivierung
S100 A12	Proinflammatorische Wirkung an Endothelzellen und inflammatorischen Zellen Neuriten-extensions-Aktivität Bindung an RAGE auf proinflammatorischen Zellen, nukleäre Translokation von NFκB und Sekretion von Zytokinen Aktivierung von MAP Kinasen und Stimulation von PLC und Ca ²⁺ /Calmodulin abhängigen Kinase II Aktivität in Neuronen

Tabelle 1.1: Funktion verschiedener S100 Proteine auf dem Gencluster auf dem Genlocus 1q21

1.6 Die Calgranuline S100A8 und S100A9

VORKOMMEN

Aktivierte Neutrophile und Monozyten spielen sowohl bei der Atherogenese als auch bei der Destabilisierung von bereits bestehenden atherosklerotischen Plaques eine wichtige Rolle. Unter der Vielzahl von S100 Proteinen sind deshalb S100A8 (MRP-8) und S100A9 (MRP-14) von besonderem Interesse, da beide vorwiegend in neutrophilen Granulozyten und Monozyten in großer Menge exprimiert werden und dort 20-40% (Neutrophile) bzw. 5% (Monozyten) des zytosolischen Proteins ausmachen (Lagasse und Clerc, 1988).

Nach Stimulation dieser Zellen werden beide Proteine als Heterodimer in das Serumkompartiment freigesetzt (Rammes et al., 1997). Gewebständige Makrophagen exprimieren unter normalen Bedingungen kein S100A8 oder S100A9. Jedoch findet sich bei entzündlichen Erkrankungen wie zystischer Fibrose und rheumatoider Arthritis eine besonders starke Expression (Odink et al., 1987). An der Zelloberfläche von aktivierten Makrophagen lässt sich S100A8/A9 bei akuten Entzündungen nachweisen. Die Aktivierung dieser Zellen zeigt sich auch an der Sekretion größerer Mengen TNF α und IL-1 β im Vergleich zu S100A8/A9-negativen Zellen (Bhardwaj et al., 1992).

ASSOZIIERTE ERKRANKUNGEN

Die Serumkonzentrationen von S100A8/S100A9 sind bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen erhöht. Als erstes wurden erhöhte Serumspiegel bei Patienten mit zystischer Fibrose entdeckt (Dorin et al., 1987), erst später entdeckte man, daß es sich bei diesem „*Cystic fibrosis antigen*“ um ein S100-Protein handelt (Bruggen et al., 1988). Später konnte auch für die rheumatoide Arthritis (Frosch et al., 2000), Morbus Crohn (Lugering et al., 1995) und Colitis ulcerosa (Lugering et al., 1995) gezeigt werden, daß die S100A8/S100A9-Serumspiegel mit der Krankheitsaktivität korrelieren. Erhöhte Serumspiegel finden sich ferner bei Transplantatabstoßung (Burkhardt et al., 2001), eine gesteigerte Expression findet sich in Geweben aus kolorektalen Karzinomen (Stulik et al., 1999). Auch für die HIV-Erkrankung konnte eine Korrelation von Serumspiegeln mit dem Krankheitsstadium gezeigt werden (Lugering et al., 1995). Eine besondere pathogenetische Rolle scheint auch hier dem Heterodimer aus S100A8/S100A9 zuzukommen, da es die HIV-Transkription und Virusproduktion in T-Lymphozyten reguliert (Ryckman et al., 2002). Aber auch andere Gewebe können unter bestimmten Bedingungen S100A8 und S100A9 exprimieren, wie z.B. Keratinozyten von Patienten mit Lichen planus, Lupus erythematoses und Psoriasis vulgaris (Kunz et al., 1992) oder

aber Mikroglia bei Patienten mit zerebraler Malaria (Schluesener et al., 1998).

STRUKTUR

Beide Proteine bilden bevorzugt Heterodimere miteinander, weil offenbar die Komplementarität zwischen beiden Proteinen durch die einzelnen Homodimere nicht wiedergegeben werden kann (Hunter und Chazin, 1998). Die Dimerbildung ist in Gegenwart von Kalzium besonders begünstigt, ebenso können aber unter Kalzium auch Trimere (A82A9) und Tetramere (A82A92) gebildet werden (Teigelkamp et al., 1991).

FUNKTION

Bereits bekannt ist, daß S100A8 und S100A9 die Adhäsion von Neutrophilen am Endothel fördern, chemotaktisch auf Monozyten wirken und die LDL-Aufnahme in diese verstärken (Lau et al., 1995). Mac-1 (CD11b/CD18), ein beta-2-Integrin, ist ein wichtiges Bindungsmolekül auf der Oberfläche von Neutrophilen und Monozyten, welches für die Adhäsion an Endothelzellen über ICAM-1 notwendig ist. Die Expression dieses Bindungsmoleküls wird durch Stimulation von neutrophilen Granulozyten mit CP-10 (Maus CP-10 entspricht dem humanen S100A8) massiv gesteigert (Devery et al., 1994). Newton und Hogg fanden heraus, daß humanes rekombinantes S100A9 die Adhäsion von Neutrophilen am Endothel über die vermehrte Expression von Mac-1 stimuliert, während humanes rekombinantes S100A8 alleine diesen Effekt nicht zeigte, sondern den Effekt von S100A9 abschwächte (Newton und Hogg, 1998). Somit spielt möglicherweise die Bildung des Heterodimers eine regulatorische Rolle und gibt somit Hinweise auf eine unterschiedliche Funktionen dieser Proteine in verschiedenen Spezies. Die *hinge-region* von CP-10 (S100A8 der Maus) wirkt chemotaktisch auf Makrophagen, diese können signifikant mehr LDL akkumulieren als nicht stimulierte Makrophagen und weisen mehr Scavenger-Rezeptoren auf (Lau et al., 1995). CP-10 (S100A8) wirkt auch auf Neutrophile chemotaktisch (Cornish et al., 1996). Eine weitere wichtige Funktion für die Bildung entzündlicher Mediatoren spielt das S100A8/A9-Heterodimer vermutlich über eine Modulation des Arachidonsäurestoffwechsels. Nur das Heterodimer ist in der Lage ungesättigte Fettsäuren (Siegenthaler et al., 1997) und Arachidonsäure (Klempt et al., 1997) mit hoher Affinität zu binden und die Aufnahme in Zellen zu fördern.

1.7 Fragestellung

Bei Diabetes mellitus anfallende Glykierungsprodukte (AGEs) führen über ihren Rezeptor RAGE zu einer Aktivierung NF-kappaB abhängiger proinflammatorischer Signaltransduktionsmechanismen. Die Bedeutung dieses Pathomechanismus ist für die Atheroskleroseentstehung tierexperimentell belegt. Für die Aktivierung der RAGE-Kaskade wird ein *"two-hit-model"* propagiert, in welchem neben einer chronischen Präaktivierung durch AGEs ein zweiter Stimulus als *"second hit"* zu einer überschießenden Inflamationsantwort führt.

Diese Zusammenhänge legen nahe, daß das S100A8/S100A9 Heterodimer als Sekretionsprodukt neutrophiler Granulozyten und Makrophagen eine wichtige positiv regulatorische Rolle in der Entwicklung chronisch inflammatorischer Prozesse spielt, wobei dies über eine Aktivierung der RAGE/NFκB abhängigen Signaltransduktion geschieht. Diese Arbeit verfolgt daher das Ziel, am Modell der Endothelzellkultur aus humanen Nabelschnurvenen (HUVEC) die physiologische Signifikanz für RAGE vermittelte proinflammatorische Effekte von S100A8/S100A9 zu belegen. Die vorliegende Arbeit sollte insbesondere erste Aufschlüsse darüber geben, inwiefern sich hieraus ein neuer Regulationsmechanismus für die Initiierung einer NFκB assoziierten chronisch-inflammatorischen Erkrankung des Gefäßbettes ableiten läßt, der gegebenenfalls über eine gezielte Blockade der Interaktion von S100A8/S100A9 mit RAGE neue therapeutische Optionen eröffnet.

2 Materialien

2.1 Geräte

Ultraschall Sonifyer 250, Fa. Branson
Zentrifuge Centrikon T-124, Fa. Kontron
SpeedVac SC100, Fa. Savant
Höfer Kammer, Fa. LKB, Bromma, Schweden, 2001-001
Power Supply EPS 3500 XL, Fa. Pharmacia, Freiburg
Power Supply EPS 600, Fa. Pharmacia, Freiburg
Kühlaggregat Multitemp III, Fa. Pharmacia, Freiburg
Elektrophoresekammer Multiphor II, Fa. Pharmacia, Freiburg
Tischzentrifuge Sepatech, Fa. Heraeus
Tankblot-Kammer, E. Wetzell, Laborgerätebau, Zürich, Schweiz
Filmkassette Suprema, Fa. Dr. Goos,
Röntgenfilmentwickler der Abt. für Röntgendiagnostik MU Lübeck
Autoklav, SanoClav, Fa. Wolf, Geisslingen
Schüttler, E. Bühler Laborgerätebau, SM 25
10 ml Gewbekulturröhrchen, Greiner
2 Kocherklemmen (150mm und 220 mm) (steril)
20 ml Spritze, B. Braun Melsungen
5 ml, 10 ml Pipetten, Greiner
50 ml Röhrchen, Sarstedt
Biocidal ZF Desinfektionsspray, WAK Chemie Medical GmbH
Brutschrank 6060, Heraeus
CO₂-Brutschrank, Heraeus
Dreiwegehahn, B. Braun Melsungen
Eppendorfpipetten : 100 µl – 1000 µl
Glaspasteurpipetten, Magazin
Knopfkanüle (steril)
Nierenschale (steril)
OP-Abdecktücher, Lohmann
Pipettierhilfe, Hirschmann
Reaktionsgefäße 2,0 ml , Eppendorf
Skalpell No.22, Feather
Stativ, Hassa Laborbedarf
Steriflip Filtereinheit <50ml Volumina, Millipore

Sterilisationsbeutel, W.M.L. Lopac von Hassa
Sterile Arbeitsbank Klasse II, Heraeus
Sterile Handschuhe, Biogel
Wasserstrahlpumpe
Zellkulturflaschen 75 cm², Nunc
Zentrifuge Megafuge 1.0, Heraeus
DNA-Bindeplatte, Costar 2525

2.2 Laborbedarf

Alle üblichen Verbrauchsgüter wurden - soweit nicht anders aufgeführt - über das zentrale Warenlager der Med. Universität zu Lübeck.

0,45 µm Filters, Fa. Millipore, SLAA025NB
Einmalküvetten , Fa. Brand, 7590 15
Whatman Filterpapier, Fa. Schleicher und Schüll, GB004
PVDF-Membran: Immobilon™-P, Fa. Millipore, Bedford, MA, USA, IPVH 000 10
Autoradiographiefilm: Hyperfilm ECL, Amersham, Little Chalfont, GB, RPN2103H
Autoradiographiefilm Hyperfim-MP, Amersham, Little Chalfont, GB, RPN6H
ELISA-Kit sICAM-1, Diaclone 850.540.192
ELISA-Kit sVCAM-1, Diaclone 850.580.192
ELISA-Kit MCP1, Biosource KHC0016
ELISA-Kit IL-6, Diaclone 850.530.192

2.3 Reagenzien

Die standardmäßigen Chemikalien wurden über die Apotheke der Med. Universität zu Lübeck bezogen. Es wurden Chemikalien der Firmen Merck (Darmstadt), Riedel-de Haen (Seelze) und Roth (Karlsruhe) verwendet.

PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid), Boehringer Mannheim, Mannheim, 837091
EGTA, Fa. Serva, Heidelberg
DC Protein Assay, Fa. BioRad, 500-0116
SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfate), Fa. Serva, Heidelberg, 20760
Tricin, Sigma, Steinheim, T-7911
Taurin, Sigma, Steinheim, T-0625
Acrylamid, Fa. Pharmacia, Freiburg, 17-1300-02

Bisacrylamid, Fa. Pharmacia, Freiburg, 17-1304-02
Bromphenolblau, Fa. Merck, 8127
 β -Mercaptoethanol, Fa. Merck, 805740
TEMED, Sigma, T-2250-0
Prestained Low Proteinstandard, 18,5 - 106 kDa, Fa. BioRad, 101-0305
Immobiline^R DryStrip Kit, Fa. Pharmacia, Freiburg
Immobiline Dry Strip pH 3-10L, 11cm, Fa. Pharmacia, 18-1016-61
Harnstoff, Fa. BioRad, 161-0730
Triton X-100 Fa. Sigma, T-9284
DTT (Dithiothreitol), Fa. Serva, Heidelberg, 20710
Glutaraldehyd, Fa. Serva, 23114
Ponceau S Konzentrat, Fa. Sigma, P-7170
Tween 20, Fa. BioRad, 170-6531
Western-Light PlusTM Chemiluminescent Detection System, Fa. Tropix, Bedford, USA
Formaldehyd, Fa. Sigma, F-1635
Aqua dest., B.Braun
Dispase, Roche
DMEM-Medium, Gibco
Fetales Kälberserum (FKS) zertifiziert, Biochrom
Gelatine, Sigma
Mucosol, S&B
PBS, Biochrom
Supplement Mix, PromoCell
Vancomycin, Lilly
70 % vergällter Alkohol, Apotheke
Pefabloc SC, Roche 1 429 868
Anti rabbit MAB, Sigma A2074
p65 C-rel Kontrollpeptid, Rockland 100-4165
ECGS, Promocell C-30140

3 Methoden

3.1 Proteinsynthese

3.1.1 AGE Synthese

AGE (Advanced Glycation End Products) entstehen im menschlichen Organismus in wiederholter nichtenzymatischer Glycosylierung und Oxidation von Proteinen.

Die Präparation von AGE (Advanced Glycation End Products) erfolgte nach dem Protokoll von Bierhaus (Bierhaus et al., 1997). Hierbei wurde 1 g BSA

(Sigma Aldrich) in 10 ml PBS mit 0,5 M Glucose für 6 Wochen bei 37°C inkubiert . Zusätzlich wurden 2 µl/ml PMSF, 2,5 mM EDTA, sowie 100U/ ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin hinzugegeben. Im Anschluss erfolgte die sterile Filtration.

Der Nachweis der biologischen Aktivität erfolgte im *One Stage Clotting Assay* (siehe 3.3.1)

3.1.2 Herstellung des Heterodimers aus S100A8 und S100A9

Rekombinantes, humanes S100A8 und S100A9 wurde von der Firma BMA (Basel, Schweiz) bezogen. Bekanntermaßen bilden beide Proteine bevorzugt die Heterodimerform, insbesondere in der Gegenwart von Kalzium (Hunter und Chazin, 1998).

(1) S100A8-Homodimer

148 µM S100A8 (1,6 g/l)

0,1% Na-Cholat

1 mM EDTA

1 mM 2-Mercaptoethanol

(2) S100A9-Homodimer

106 µM S100A9 (1,4 g/l)

0,1% Na-Cholat

1 mM 2-Mercaptoethanol

0,01% Sarkosyl

Jeweils 106 nmol der beiden gelösten Proteine, entsprechend 716 µl S100A8 und 1000 µl

S100A9, wurden in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Anschließend wurde die Kalzium-Konzentration im Reaktionsgefäß mittels einer Stock-Lösung auf 2 mM CaCl₂ eingestellt. Schließlich erfolgte eine Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur. Danach wurden die Proteine bis zu ihrer Verwendung in Aliquots bei -20°C gelagert. Die Qualitätskontrolle der Dimerisierungsreaktion bzw. des Proteins wurde anhand eines Double-Sandwich-ELISA bestätigt (Art.-Nr. S-1009, Fa. BMA, Basel, Schweiz) durchgeführt, welcher ausschließlich das Heterodimer aus S100A8 und S100A9 nachweist.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Endothelzellpräparation und Kulturbedingungen

Die Präparation der Endothelzellen erfolgte nach Jaffe et al. 1973 aus der Vena umbilicalis humaner Nabelschnüre maximal 72 Stunden post partum, wobei die Aufbewahrung in steriler Ringerlösung bei 4°C erfolgte. Es wurde hierbei auf eine Mindestlänge von 20 cm geachtet, um eine Zellausbeute von mindestens 1 x 10⁶ Zellen zu gewährleisten.

Die Nabelschnüre wurden mit freundlicher Genehmigung der Klinik für Frauenheilkunde der Universität zu Lübeck, sowie der Mütter der Neugeborenen verwendet.

Isolationsvorgang unter sterilen Bedingungen (Bench) :

- Knopfkanüle (autoklaviert) in die Vene einführen
- Mit Hilfe von 2-3 Kabelbindern die Nabelschnur abbinden
- Dreiwegehahn mit der Knopfkanüle konnektieren
- die große Klemme unterhalb des Dreiwegehahns befestigen und Nabelschnur am Stativ aufhängen
- großzügig mit Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) durchspülen (20 ml Spritze)
- distales Ende der Nabelschnur ebenfalls abklemmen und durch Zugabe von DMEM, die Nabelschnur auf Dichtigkeit prüfen
- distales Ende wieder öffnen und das DMEM ablaufen lassen
- mit ca. 15ml Dispase-Lösung (160 E/40 ml DMEM die Nabelschnur) vorspülen
- NS erneut verschließen und mit Dispase Lösung füllen
- Dreiwegehahn verschließen und 30min. in einem sterilen Gefäß bei 37°C inkubieren
- Nach der Inkubationszeit die Nabelschnur wieder am Stativ aufhängen und eine neue Spritze befestigen

- anschließend 15 ml DMEM + 10%FCS in die neue Spritze geben, die Dispase Lösung im Röhrchen auffangen,
den Dreiwegehahn öffnen und nun das DMEM ablaufen lassen und im gleichen Röhrchen auffangen
- Röhrchen 5 min bei 4°C und 1000 min⁻¹ abzentrifugieren
- Überstand absaugen
- Pellet in 10 ml Endothelzellmedium suspendieren

Zunächst erfolgte die Beschichtung einer großen Kulturflasche mit 1% steriler Gelatine mit einer nachfolgenden Inkubation für mindestens 30 Minuten bei 37°C.

Die so gewonnen HUVEC wurden zunächst für 24h zur Förderung der Adhäsion bei Endothelzellmedium mit einem FCS Gehalt von 20% kultiviert.

Zur Unterdrückung von Fibroblasten erfolgte im Anschluß, für weitere 24h die Kultur in Endothelzellmedium mit einem FCS Gehalt von 5%.

<i>Endothelzellmedium</i> : RPMI 1640 – Medium	500 ml
Fetales Kälberserum 20%	100 ml
L-Glutamin 0,1%	5 ml
Pen./Strep 0,1%	5 ml
HEPES 0,125%	7 ml
Heparin	25 mg
Endothelial Cell Groth Supplement	2 ml
Polymyxin B	500 µl

Unter Kulturbedingungen herrschte eine Temperatur von konstant 37°C bei einer Atmosphäre von 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95%.

3.2.2 Passagierung der Kulturen

Die Passagierung der Kulturen erfolgte bei einer Konfluenz von 80-90 %, in folgenden Schritten

- altes Medium absaugen,
- 1x mit PBS waschen,
- 2-5 ml Trypsin (37°C) aufpipettieren und ca. 30 sec. bis 1 min. einwirken lassen
- inaktivieren mit 10-15 ml Endothelzell-Medium
- mit Pipette Kulturflasche spülen (so daß sich die Zellen ablösen) und das Medium mit

- den Zellen in einem
- Suspension in 50ml-Röhrchen auffangen
 - 5-10 min bei 4⁰C und 1000 min⁻¹ abzentrifugieren
 - zwischenzeitlich PBS in die neuen, gelatinisierten Kulturflaschen geben und Reste absaugen
 - Überstand absaugen,
 - Pellet in z.B. 5 ml Endothelzell-Medium aufnehmen
 - Zellzahl bestimmen und nicht mehr als 10⁶ Zellen / 75 cm² Flasche aussäen
 - Mediumwechsel am nächsten Tag

Für die Stimulationsversuche wurden HUVEC in der 3. Passage verwendet, und dabei nicht länger als drei Wochen in Kultur belassen.

3.2.3 Stimulationsversuche

Im ersten Schritt erfolgte die Umsetzung der Endothelzellen auf sechs-Kavität Platten mit 150.000 Zellen / Kavität (9,6cm²) in 2 ml Medium und einer Adhärenzzeit von 24 Stunden. Die Stimulation erfolgte bei konfluenten Kulturen in Endothelzellmedium mit 5% FCS.

Versuchsaufbau :

Der nachfolgende Versuchsaufbau unterteilt sich in zwei Gruppen die jeweils mit dem Heterodimer S100A8/A9 stimuliert wurden.

Die mit AGE vorstimulierte Gruppe simuliert hierbei die pathophysiologischen Bedingungen des Diabetes mellitus, in dem ein in unterschiedlichen Stufen vorliegendes glykiertes und oxydiertes Protein-Gemisch vorliegt. Der Vergleich erfolgte gegen ein nicht glykiertes Gemisch aus Glucose und BSA (Bierhaus et al., 1996).

- 1.) Prästimulation mit 1000 ng/ml AGE für 48 h gegen die Vergleichsgruppe mit Glucose und Bovinen Serum Albumin (BSA), danach Absaugen des Mediums mit anschließender zweimaliger Spülung mit PBS
- 2.) Stimulation mit S100A8/S100A9 in den Konzentrationen 1000 nM; 100 nM; 10 nM; 1 nM, jeweils steril filtriert für 72 h.
- 3.) Für die Positivkontrolle wurden HUVEC mit Lipopolysaccharid (Sigma-Aldrich) in einer Konzentration von 1 ng/ml und mit TNF α (Sigma-Aldrich) 1 ng/ml stimuliert.

Nach Beendigung der Stimulation erfolgte die Asservierung der Zellkulturüberstände in sterile Eppendorf-Gefäße. Die Zellen wurden auf nicht-enzymatischen Wege (Cellscrapper) gelöst und 5 min bei 4°C und 1000 min⁻¹ abzentrifugiert, dann bei -20°C asserviert.

Die Stimulationszeiten betragen 48 und 72 h . Nach Beendigung der Stimulation erfolgte die Asservierung der Zellkulturüberstände in sterile Eppendorff-Gefäße. Die Zellen wurden auf nicht-enzymatischen Wege gelöst und in analoger Weise asserviert.

3.2.4 Inhibitionsversuche

Die Inhibitionsversuche erfolgten in den Schritten 1.) und 2.) analog zu 3.2.3 . Jeweils eine Stunde vor Proteinstimulation (Schritt 3.) wurden die Inhibitoren zugesetzt. Der p38-Inhibitor SB 203580 wurde zunächst in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und in einer Konzentration von 20 nM eingesetzt. Dementsprechend wurde als Negativkontrolle Medium mit Glucose , BSA und DMSO eingesetzt (Davies et al., 2000).

Der MAP Kinase Kinase (MEK) Inhibitor PD 98059 wurde in einer Konzentration von 30 µM eingesetzt. Als Hemmstoff des Hydroxymethylglutaryl Coenzym A wurde Simvastatin in einer Konzentration von 10 µM eingesetzt.

3.3 Analytik

3.3.1 *One Stage Clotting Assay* zum Nachweis der prokoagulatorischen Aktivität an der Endothelzelloberfläche

Reagenzien und Ansatzprotokoll:

- 3 maliges Spülen der Zellkultur mit PBS
- nicht-enzymatisches Ablösen der Zellen
- abzentrifugieren der Zellen 5 min bei 5000 min⁻¹
- suspendieren des Zellpellets in 100 µl Barbitalpuffer (Natriumbarbital 38 mmol/l, NaCl 125 mmol/l, pH 7,35
- Zugabe von 100 µl zitrierten Normalplasma
- starten der Reaktion mit 100 µl CaCl₂ 25 mM
- Messung der Zeit bis zum Fibrinausfall bei 37°C

3.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung

Zur Anwendung der Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung erfolgte die Messung mittels DC Protein Assay der Fa. Biorad (Lowry et al.) Als Standardprotein wurde der BSA-Standard der Fa. Bio-Rad eingesetzt . Die Proben wurden in dergestalt verdünnt, bis die Proteinkonzentration im linearen Messbereich des Assays zwischen 0,1 und 1 mg/ml lagen.

Reagenzien und Ansatzprotokoll :

- 50 µl Probe bzw. Standard in ein Reagenzglas pipettieren
- 250 µl alkalische Kupfertartrat-Lösung + 2 µl Detergens dazu pipettieren
- 2 ml verdünntes Folin-Reagenz dazugeben und schütteln
- nach 15 min. bis spätestens 1 h bei 750 nm Kavitätenlänge photometrisch ablesen

3.3.3 Aufarbeitung von zytoplasmatischen Proteinfractionen

Die im Vorwege stimulierten Zellen wurden in eiskaltem PBS nichtenzymatisch abgelöst und für 5 Min. bei 2000 Min^{-1} bei 4°C zentrifugiert.

Das so gewonnene Zellsediment wurde mit 1ml PBS gewaschen, resuspendiert und erneut abzentrifugiert . Das Pellet wurde im Anschluß in 200 µl Puffer A aufgenommen und für 10 sec verschüttelt, mit nachfolgender Inkubation für 15 Min. auf Eis. Zur chemischen Zellyse erfolgte die Zugabe von 12,5 µl 10% NP-40 wiederum mit nachfolgender 5 minütigen Inkubation auf Eis. Abschließend erfolgte die Zentrifugation bei 15000 min^{-1} für 30 sec.

Puffer A_{west} : 10mM HEPES pH 7.9
10mM KCL
0,1mM EGTA
0,1mM EDTA
1mM DTT
0,5mM PMSF

3.3.4 Western-Blot für RAGE

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels eines 10% Trenngels und eines 5% Sammelgels. Pro Geltasche wurden 20 µg zytoplasmatisches Protein aufgetragen, welche zuvor für 5 min. bei 95°C erhitzt wurde. Der Gellauf fand unter folgenden Laufbedingungen statt :

- (1) Start bei 50 V (10 V/cm Trennstrecke) , bis die Probe komplett aus den Taschen in das Sammelgel übergetreten ist .
- (2) Konstante Stromstärke bei 30 mA/cm²

Für den Proteintransfer wurde die PVDF Membran für eine Minute mit Methanol benetzt und dann für 10 min im Transferpuffer aquilibriert. Das 3MM Whatman Papier wurde ebenfalls mit Transferpuffer getränkt.

Beim Vorbereiten des Transfersandwich waren Luftblasen stets zu beseitigen.

Laufbedingungen für den Blot :

- (1) konstante Spannung mit $U = 50 \text{ V}$ für 2 Stunden

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran übernacht bei 4°C in Blockierpuffer belassen. Am nächsten Tag wurde die Membran 2 x mit 0,5 % PBS Tween gewaschen. Der erste Antikörper Maus anti RAGE (Fa.Chemicon MAB5328) wurde in einer Konzentration von 1:2000 in Blockierpuffer eingesetzt und für 1 Stunde inkubiert. Anschließend erfolgten 2 Waschvorgänge in PBS-Tween 0,05% für 10 min. Der zweite Antikörper Ziege anti Maus POD (Fa.Dianova) wurde in einer Konzentration von 1:10.000 eingesetzt und für 45 min. inkubiert und wiederum in PBS-Tween 0,05% gewaschen. Die Detektion erfolgte mit einem 1:1 Einsatz von Reagenz 1 und Reagenz 2 des Amersham ECLplus-Detection-Kit und einer Inkubationszeit von 1 min.

Die Expositionszeit mit einem Autoradiographiefilm (Fa.Amersham) betrug zwischen 10 sec. bis 10 min.

Lösungen und Puffer :

(1)10x SDS Laufpuffer	0,25 M Tris	30 g	
	2 M Glycin	144 g	
	10% SDS	100 ml	/ ad 1000 ml ddH ₂ O
(2)Transferpuffer	15 mM Glycin	5,8 g	
	15 mM Tris	11,6 g	
	10% SDS	7,4 ml	
	20% Methanol	400 ml	/ ad 2000 ml ddH ₂ O
(3)10x TBS	0,25 M Tris	30,28 g	
	1,5 M NaCl	87,66 g	
	10 mM CaCl ₂	1,50 g	
	pH 7,5		/ ad 1000 ml ddH ₂ O
(4)0,05 % PBS-Tween	Tween	0,5 ml	
	1x PBS	1000 ml	
(5)Blockierpuffer	Dry Milk	2 g	
	PBS-Tween	40 ml	

3.3.5 Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Die Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen erfolgte mittels Silberfärbung, da dieses Verfahren bei niedrigen Proteinkonzentrationen die beste Sensivität bietet (Oakley et al., 1980)

Alle Lösungen wurden unmittelbar vor der Färbung angesetzt

Reagenzien und Lösungen:

(1) <i>Fixierlösung</i>	30 % Ethanol	600 ml	
	10 % Essigsäure	200 ml	/ ddH ₂ O ad 2 l
(2) <i>Sensitivierlösung</i>	30 % Ethanol	75 ml	
	0,5 M Natriumacetat	10,25 g	
	0,5 % Glutaraldehyd	1,25 ml	
	0,2 % Natriumthiosulfat	0,5 g	/ ddH ₂ O ad 250 ml
(3) <i>Silbernitratlösung</i>	0,2 M AgNO ₃	10 ml (2,5 M Stock)	
	0,02 % Formaldehyd 37%	50 µl	/ ddH ₂ O ad 125 ml
(4) <i>Entwicklerlösung</i>	3 % Na ₂ CO ₃	7,5 g	
	0,01 % Formaldehyd 37%	50 µl	/ ddH ₂ O ad 250 ml
(5) <i>Stopperlösung</i>	0,05 M EDTA	4,65 g	/ ddH ₂ O ad 250 ml
(6) <i>Konservierlösung</i>	30 % Ethanol	75 ml	
	5 % Glycerin	12,5 ml	/ ddH ₂ O ad 250 ml

Färbeprotokoll

- 30 min Silber-Fixierer
- kurze Spülung mit ddH₂O
- 30 min Sensitivierlösung
- 3 x 10 min ddH₂O
- 20 min 0,2 % AgNO₃
- Entwickler 2-10 min.
- Stopperlösung mindestens 30 min
- 2 x 30 min Konservierlösung

Das Abstoppen erfolgte sobald die Proteinbanden sich deutlich anfärbten und bevor sich der Hintergrund zu färben begann.

3.3.6 Extraktion von Zellkernproteinen

Die Aufbereitung der HUVEC erfolgte für den ELISA in einem Miniextraktionsverfahren (Schreiber et al., 1989) in folgenden Schritten.

PUFFER (kalt, 4°C)

(1) PBS

(2) Puffer A II: 10 mM HEPES
10 mM KCl
0.1 mM EDTA
0.1 mM EGTA /pH 7,9

kurz vor Durchführung des Versuches:

1 mM DTT (100 µl auf 10 ml);

0.5 mM Pefabloc® Roche(Stammlösung 100 mg/ml = 0.42 M),
(12.5 µl auf 10 ml);

1 Tablette complete mini-Protease-Inhibitor® Roche (ohne EDTA)/10 ml

(3) Puffer C: 20 mM HEPES
0.4 M NaCl
1 mM EDTA
1mM EGTA /pH 7,9

kurz vor Durchführung des Versuches:

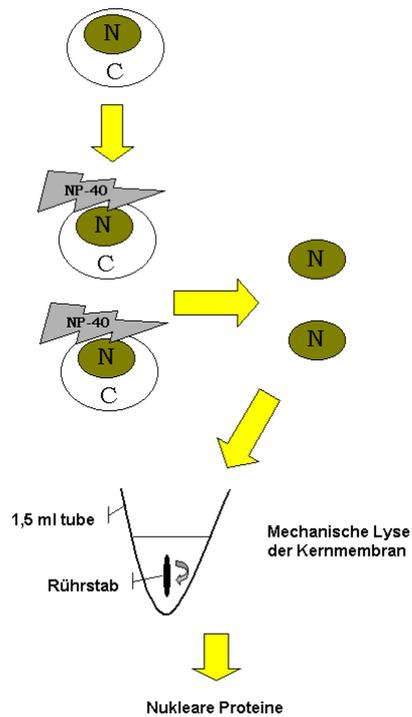
1 mM Pefabloc (25 µl auf 10 ml);

1 Tablette complete mini-Protease-Inhibitor® (ohne EDTA)/10 ml

(4) Puffer D: 10mM Tris/HCl
7 M Harnstoff,
1% SDS
0.1 M Natriumacetat
20 mM EDTA /pH 7,5

- alle Schritte dieses Protokolls wurden auf Eis durchgeführt -

1. Suspensionskulturen abzentrifugieren und adherente Zellen lösen und zentrifugieren.
2. Zellen zweimal in kaltem PBS waschen, jedesmal 5 min. bei 750 g (ca 2080 min⁻¹) zentrifugieren und den Überstand jeweils verwerfen.
3. Zellsediment in 1ml eiskaltem Puffer A II resuspendieren, auf Eis für 20 min. inkubieren und danach die Suspension in 1,5 ml kaltes, steriles Eppendorf-Gefäß überführen; dann 0,4% NP-40 (4 µl bei 1 ml) zugeben. Im Anschluß für 30 sec auf dem Rüttler mischen (chemische Lyse der Zellmembran).
4. Zentrifugation für 3 min bei 14000 min⁻¹ und 4°C. Den Überstand verwerfen.
5. das Sediment mit 500 µl eiskaltem Puffer A II (ohne NP-40) waschen und im Anschluß für 3 min bei 4°C und 14000 min⁻¹ zentrifugieren; Den Überstand absaugen und das Sediment in 50 µl eiskaltem Puffer C resuspendieren und in jedes Reaktionsgefäß ein magnetisches Minirührstäbchen geben. Bei 4°C (im Kühlschrank) mindestens 1h rühren (mechanische Lyse der Kernmembran).
6. Im Anschluß für 15 min bei 14000 min⁻¹ zentrifugieren und den Überstand vorsichtig in ein frisches Reaktionsgefäß überführen.
7. Konzentration der Proteine im Kernextrakt bestimmen.
8. Proben bei -70°C konservieren (häufiges Auftauen und Einfrieren vermeiden).

**Abbildung 3.1 :**

Schema der chemischen Zellyse nach Schreiber et al.(1989) Die Extraktion des nukleären Proteins beruht auf einer Lyse der Zellmembran mit nachfolgender mechanischer Lyse der Kernmembran mit einem Rührstab

3.3.7 NFκB p65 ELISA

Die quantitative Bestimmung des NFκB erfolgte im ELISA (Kothe et al., 2000)

Ragenzien und Lösungen:

- | | | |
|-----------------------------|---|---------|
| (1) <i>Phosphatpuffer</i> | 500 mM NaH ₂ PO ₄ , | /pH 8,5 |
| (2) <i>Positivkontrolle</i> | 1 µg/µl NFκB c-Rel (Fa. Santa Cruz) | |
| (3) <i>Puffer C</i> | 20 mM HEPES | |
| | 1 mM EDTA | |
| | 1 mM EGTA | |
| | 0,4 M NaCl | /pH 7,9 |
| (4) <i>Lösung I mit BSA</i> | 0,3 M Tris | /pH 9,5 |
| | 1M NaCl | |
| | 1% Bovines Serum Albumin (BSA) | |

(5) Lösung I ohne BSA

0,3 M Tris
1 M NaCl /pH 9,5

(6) Lösung II

20 mM Tris
10% Glycerin
100 mM NaCl
0,5 mM DTT

(7) Poly dl-dC

500 µg/ml Poly dl/dC (Fa. Roche)
in Lösung II

(8) 5'NF-kappaB-Oligo

100 µM 5'-NF-kappaB-Oligo in Phosphatpuffer (1)

(9) 3'NF-kappaB-Oligo

100 µM 3'-NF-kappaB-Oligo in Phosphatpuffer (1)

- polyklonaler Hase anti NFκB c-Rel Ab (Fa. Santa Cruz)
- anti Hase HRP konjugiert (Fa. Sigma)
- TMB-Substrat (100 ml, Fa. Sigma)
- 1 M HCl
- DNA-BIND-96-Kavitäten-Platte (Fa. Costar)

Beschichtung der ELISA-Platten:

- NF-kappaB Oligos (5µl/well) wurden vor dem Einsatz im Verhältnis 1:1 gemischt, durch Erhitzen bei 95°C für 5 min denaturiert und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt
- 500 µl des denaturierten Oligogemischs wurden mit 5 ml des Phosphatpuffers gemischt
- 55 µl wurden in jede Kavität vorgelegt und auf einem Schüttelinkubator bei 37°C für 30 min inkubiert
- Die Platten wurden 3 Mal mit PBS gewaschen
- Blockieren mit 300 µl Lösung I + BSA pro Well bei 4°C übernacht

Probenvorbereitung:*- Proben (Vierfachbestimmung):*

- 20 µl des jeweiligen nukleären Proteinextrakts
- 20 µl Puffer C +
- 140 µl Lösung II +
- 20 µl poly dI-dC (500 µg/ml) ansetzen (ng)
- und für 15 min. auf Eis inkubieren

- Blindwert (Fünffachbestimmung):

- 25 µl Puffer C
- 25 µl poly dI-dC (500 µg/ml)
- 200 µl Lösung II

- Negativ-Kontrolle (Fünffachbestimmung):

- 25 µl BSA
- 25 µl Puffer C
- 175 µl Lösung II
- 25 µl poly dI-dC (500 µg/ml)

- Positiv-Kontrolle (Fünffachbestimmung):

- 25 µl c-rel Lösung
- 25 µl Puffer C
- 175 µl Lösung II
- 25 µl poly dI-dC (500 µg/ml)

Versuchsdurchführung:

- nach dem Blockieren Platte ausklopfen,
- 40 µl der Proben bzw. der Kontrollen wurden pro Kavität auftragen und für 15 min bei RT inkubiert
- Platten wurden dreimal mit je 200 µl Lösung I ohne BSA gewaschen und ausgeklopft
- 50 µl anti NF-kappaB (1:1000 in Lösung I ohne BSA) pro Kavität, 1h Inkubation bei Raumtemperatur
- Platten wurden dreimal mit je 200 µl Lösung I ohne BSA gewaschen und ausgeklopft
- 50 µl anti rabbit HRP (1:10000 in Lösung I ohne BSA) pro Kavität, 30 min Inkubation bei Raumtemperatur

- Platten wurden dreimal mit je 200 µl Lösung I ohne BSA gewaschen und ausgeklopft
- 200 µl TMB-Substrat pro Kavität, 30 min bei RT (im Dunkeln)
- Reaktion stoppen durch Zugabe von 100 µl 1 N HCl/Kavität
- Ablesen bei 450 nm (Farbreaktion von blau nach gelb)

3.3.8 sonstige ELISA

Die Bestimmung von ICAM-1 , VCAM-1 , IL-6 und MCP-1 erfolgte mittels kommerzieller ELISA-Kits der Firma Diaclone (ICAM-1 , VCAM-1 , IL-6) und Biosource (MCP-1).

Zellkulturüberstände wurden zunächst zentrifugiert 5 min bei 8000 min⁻¹ und abdekantiert, um eventuelle Schwebstoffe zu entfernen.

Die Probenverdünnung erfolgte so, dass der zu erwartende Wert im Messbereich des jeweiligen Kits lag.

Die Messungen erfolgten streng nach Protokoll des Herstellers und in Doppelbestimmung.

3.3.9 Statistik

Die statistischen Berechnungen wurden im Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel 2000™ durchgeführt, die Berechnung zur statistischen Signifikanz erfolgte in diesem Programm nach dem Student T-Test für eine zweiseitige Fragestellung. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als signifikant gewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Prokoagulatorische Aktivierung von HUVEC unter AGE

HUVEC wurden unter den beschriebenen Zellkulturbedingungen in dritter Passage für 72 Stunden mit AGE in einer Konzentration von 1000 ng/ml stimuliert. Im folgenden wurden die prokoagulatorischen Eigenschaften im *One Stage Clotting Assay* untersucht, um die intrinsische Aktivität des synthetisierten AGE zu belegen. Untersucht wurde Calmodulin als bekanntester Vertreter der EF-Hand Proteinfamilie, sowie aus der Gruppe der S100 Proteine das S100A1, S100B und S100A8/A9. Es fanden sich hierbei deutlich herabgesetzte Koagulationszeiten nach Stimulation mit AGE und LPS, nicht jedoch bei Stimulation mit S100A8/A9, S100A1, S100B oder Calmodulin.

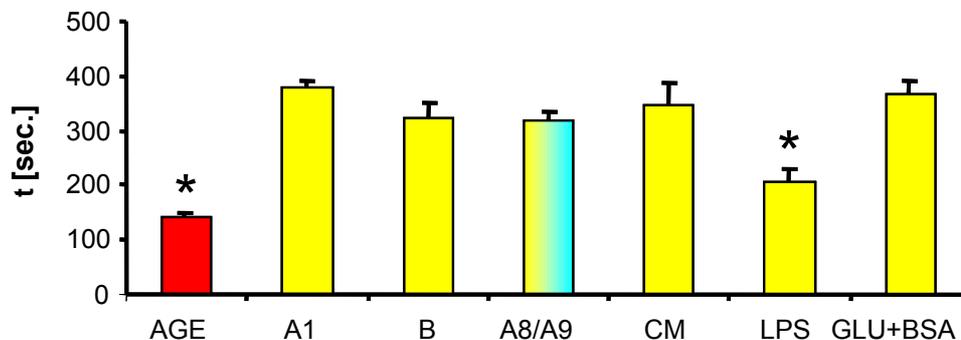


Abbildung 4.1: Signifikant ($p < 0,005$) herabgesetzte Koagulationszeiten im One Stage Clotting Assay nach Stimulation mit AGE und LPS, jedoch nicht für S100A1 (A1), S100B (B), S100A8/S100A9 (A8/A9), Calmodulin (CM) und Glucose (GLU)+BSA; n=9

4.2 Vermehrte RAGE Expression unter AGE

Im weiteren wurde die Expression des Rezeptors für AGE (RAGE) auf Endothelzellen untersucht. Dafür wurden analog zu 4.1.1 HUVEC mit AGEs und verschiedenen kalziumbindenden Proteinen stimuliert. Die Zellen wurden im Anschluß in einem SDS-haltigen Elektrophoresepuffer extrahiert, die extrahierten Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Westernblot auf eine PVDF Membran transferiert. Im Westernblot zeigte sich eine deutliche Hochregulation von RAGE in HUVEC nach AGE Stimulation, jedoch nicht nach Stimulation mit S100A8/A9.

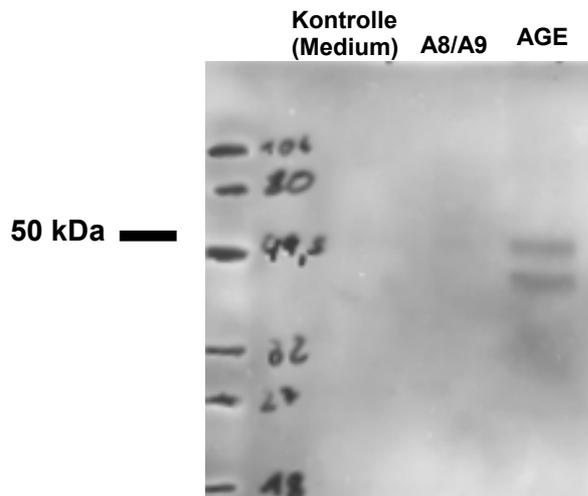


Abbildung 4.2:

Nur AGE, nicht aber S100A8/S100A9 und Glucose+BSA+Medium sind in der Lage RAGE zu induzieren. Ein synergistischer Effekt von AGE und S100A8/A9 ist nicht nachweisbar (nicht gezeigt). Die Position des *prestained Standards* (Fa. Bio Rad) auf der Blotmembran wurde mit einem Filzstift auf den wiederaufgelegten Film markiert.

4.3 RAGE / S100A8/S100A9 Interaktion

Ausgehend von den in 4.1 gemachten Beobachtungen wurden HUVEC wie im Methodenteil beschrieben stimuliert.

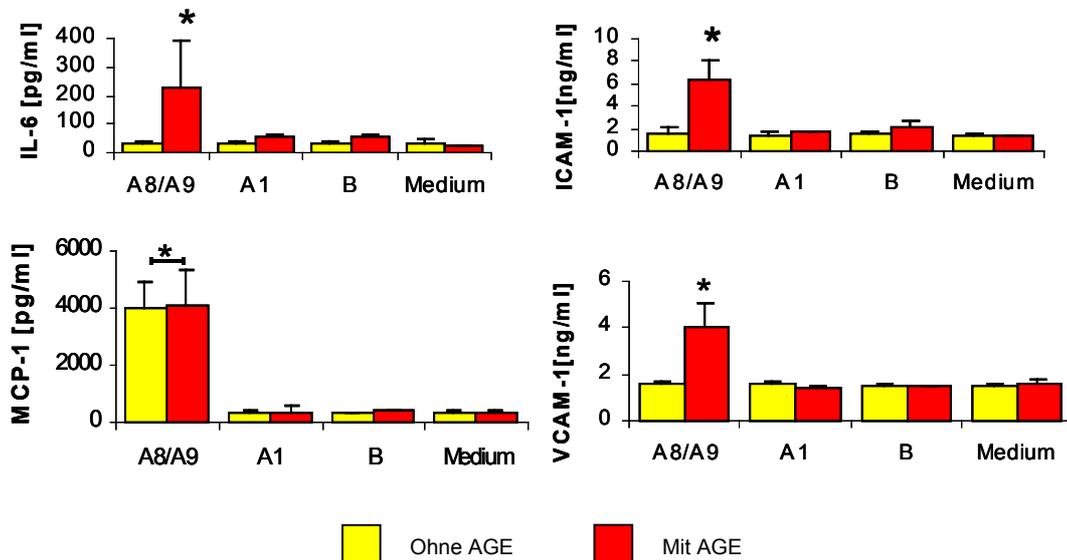
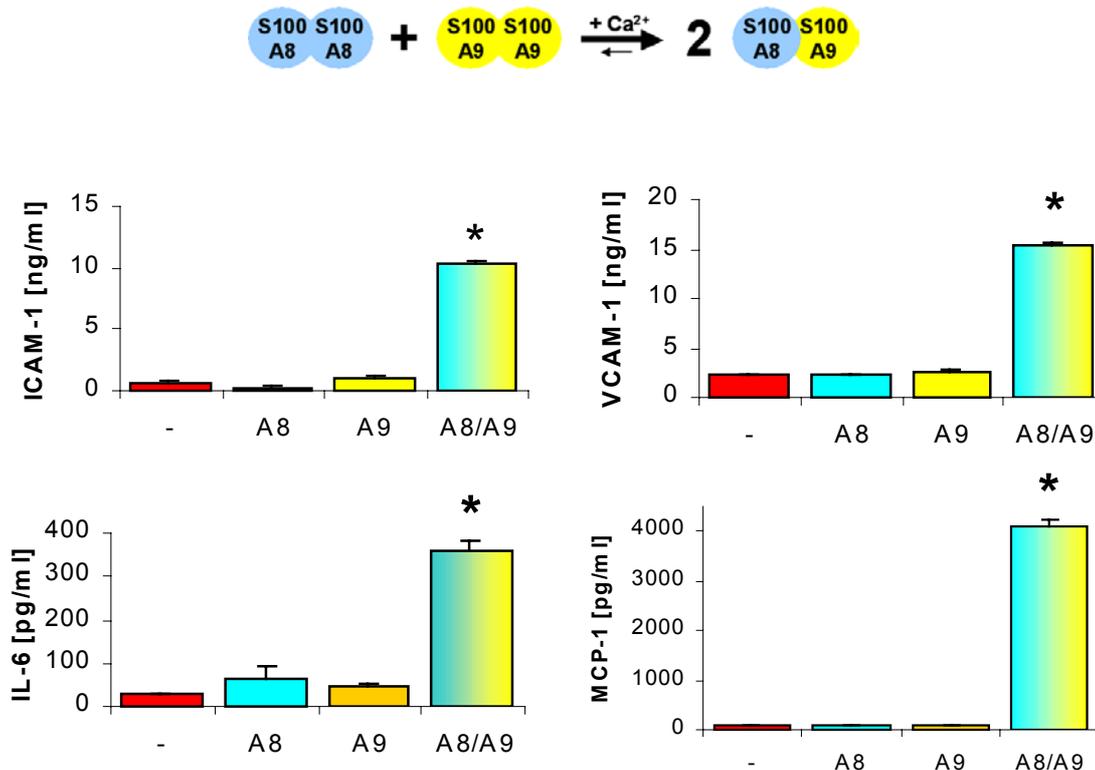


Abbildung 4.3: Deutlich synergistischer Effekt von AGE und S100A8/A9 bei der Sekretion von IL-6, ICAM-1 und VCAM-1. Unabhängig von der AGE Prästimulation kommt es zu einer vermehrten Sekretion von MCP-1. Keinerlei Effekte finden sich bei der Stimulation mit S100A1 (A1) und S100B (B). n=4

Unter diesen Bedingungen zeigte sich ein deutlich synergistischer Effekt von S100A8/A9 und AGE. Während nach alleiniger Stimulation der Endothelzellen mit dem Heterodimer S100A8/S100A9 keine Effekte zu dokumentieren waren, führte S100A8/S100A9 zu einer starken Sekretion von IL-6, VCAM-1 und ICAM-1, durch eine 72 stündige Vorinkubation mit AGE-Albumin signifikant gesteigert worden war. Eine Ausnahme ergibt sich in diesem Versuchsansatz für MCP-1, das auch ohne AGE Prästimulation durch S100 A8/A9 signifikant erhöht gemessen wurde. Andere Vertreter der S100 Familie (S100A1 und S100B) zeigten hier keine proinflammatorischen Effekte, so dass die hier gemessenen Daten als spezifisch für S100A8/A9 anzusehen ist.

4.4 Effekte in Abhängigkeit von der Heterodimerform von S100A8 und S100A9



Lediglich der Einsatz des Heterodimers S100A8/A9 nach AGE Vorstimulation führte zu einem signifikanten Anstieg der beobachteten Parameter. Der Einsatz der Homodimere S100A8 und S100A9 zeigte keine signifikante Steigerung der beobachteten Parameter gegenüber der Negativkontrolle.

4.4.1 Dosis-Wirkungs-Beziehung von S100A8/A9

Zur Untersuchung der Dosis-Wirkungs-Beziehung wurde S100A8/A9 in 1000, 100, 10 und 1nM Konzentration mit und ohne AGE Vorstimulation eingesetzt.

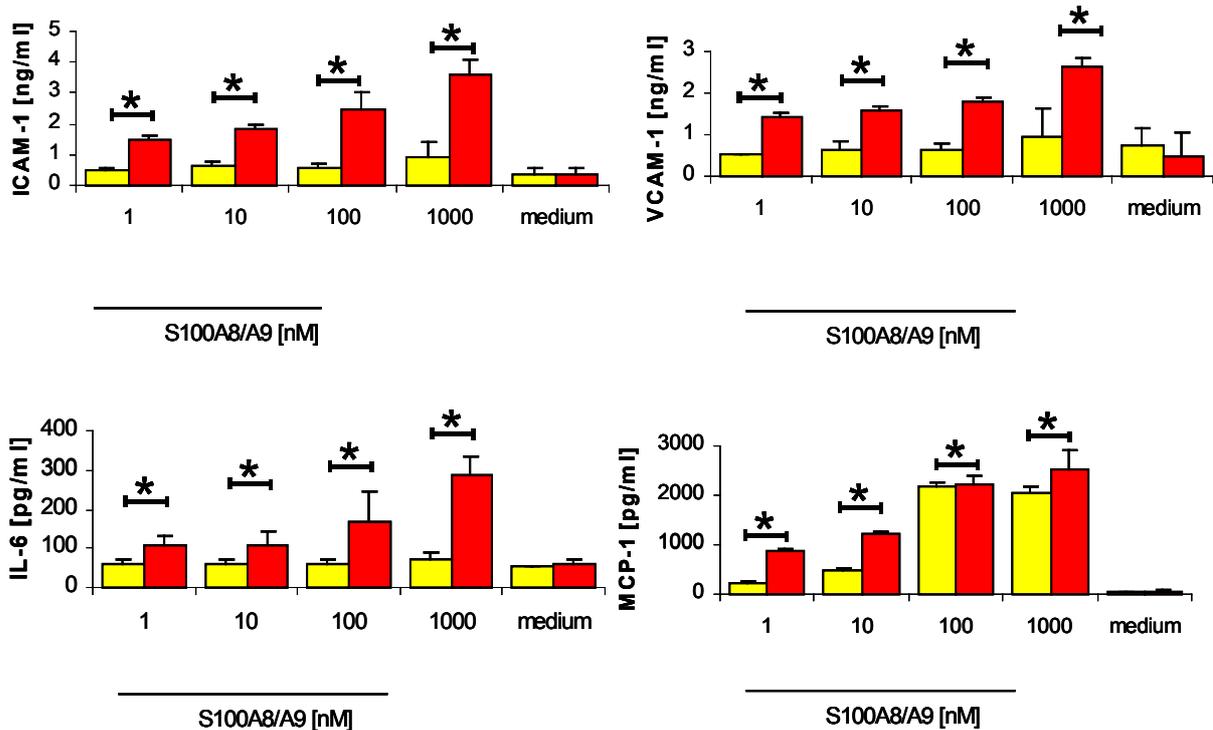


Abbildung 4.5: Bereits unter 1nM S100A8/A9 Koinkubation mit AGE kommt es zu einer signifikanten Steigerung der Sekretion von ICAM-1, VCAM-1, IL-6 und MCP-1, welche mit steigender Konzentration von S100A8/A9 weiter zunimmt. Im Gegensatz hierzu führt die alleinige Stimulation mit S100A8/A9 in keiner der untersuchten Konzentrationen zu einer signifikanten ($p < 0,005$) Steigerung der Sekretion von ICAM-1, VCAM-1 oder IL-6. Lediglich MCP-1 wird auch ohne AGE Koinkubation signifikant durch S100A8/A9 gesteigert. $n=4$

Im Unterschied zu der dosisabhängigen Steigerung der Sekretion von IL-6, ICAM-1, VCAM-1 die nur nach AGE Vorstimulation zu beobachten ist, scheint die Stimulation durch MCP-1 einen AGE-unabhängigen Effekt zu bewirken und somit zu einer Sensitivierung der Endothelzellen für S100A8/S100A9 zu führen.

4.4.2 Signaltransduktionswege unter S100A8/S100A9, RAGE und NF- κ B

Am Modell der kultivierten Endothelzelle sollten die Signaltransduktionsmechanismen der S100/RAGE/NF κ B-Sequenz näher untersucht werden. Anhand der im folgenden aufgeführten Untersuchungen soll insbesondere ein Profil des S100A8/A9 assoziierten Effektes der NF κ B-Aktivierung aufgezeigt werden. Verwendet wurden die spezifischen Blockiersubstanzen PD 98059 (i p44/42) , SB 203580 (i p38/JNK) und Simvastatin (i p²¹ras).

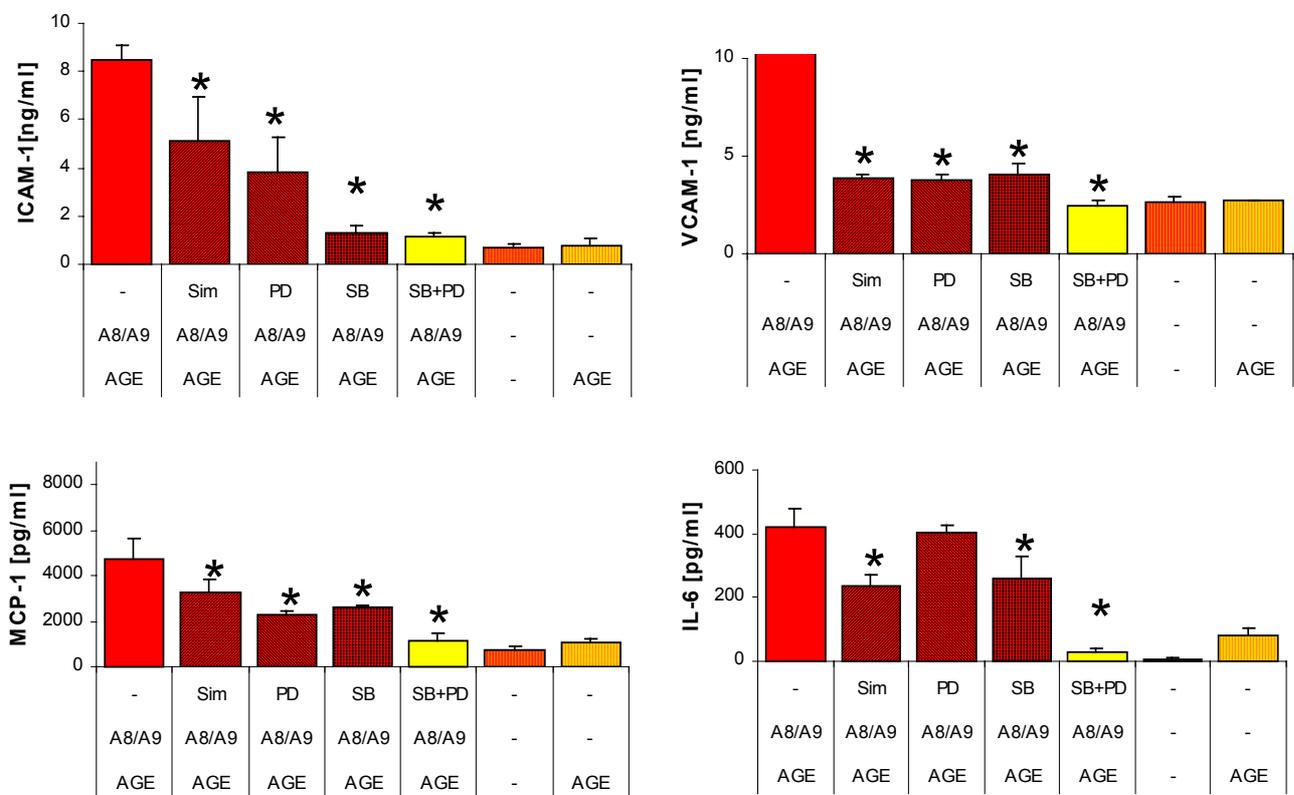


Abbildung 4.6: Die Blockade von p²¹ras (Simvastatin), p44/42 (PD 98059) und p38/JNK (SB 203580) zeigten eine signifikante ($p < 0,005$) Reduktion der unter AGE/ S100A8/A9 dokumentierten Sekretion proinflammatorischer Komponenten, wie ICAM-1, VCAM-1, MCP-1 und IL-6.

Nach Applikation der oben aufgeführten Substanzen zeigt sich eine signifikante Reduzierung der Sekretion von IL-6, ICAM-1, VCAM-1 und MCP-1 unter PD 98059 (30 μ M), SB 203580 (20 nM) und Simvastatin (10 μ M). Diese Beobachtungen lassen daher vermuten, dass die unter AGE/ S100A8/A9 dokumentierten Effekte über p²¹ras, ERK 1/2, sowie p38/JNK abhängige Signaltransduktionswege vermittelt werden.

4.4.3 MAP Kinasen Aktivierung unter AGE / S100A8/A9

Da viele Proteinkinase-Inhibitoren nicht zu 100% spezifisch sind, war es notwendig die signifikante Aktivierung der MAP-Kinasen p38 und ERK1/2 unter gleichen Versuchsbedingungen wie in 4.3.2 mittels Westernblot zu dokumentieren. Hierfür wurden Westernblots von Zellextrakten mit spezifischen Antikörpern gegen die aktivierte (phosphorylierte) Form von ERK1/2 und p39/JNK durchgeführt. Diese Versuch zeigen, daß es auch ohne AGE-Vorstimulation durch S100A8/S100A9 zu einer geringen Aktivierung von p38 und Erk1/2 kommt. Diese ist jedoch signifikant niedriger ausgeprägt als in AGE-vorbehandelten HUVECs. Dies ist somit ein weiterer Beleg für die Modulation der durch S100A8/S100A9 abhängigen Effekte durch die MAP-Kinasen p38 und Erk1/2.

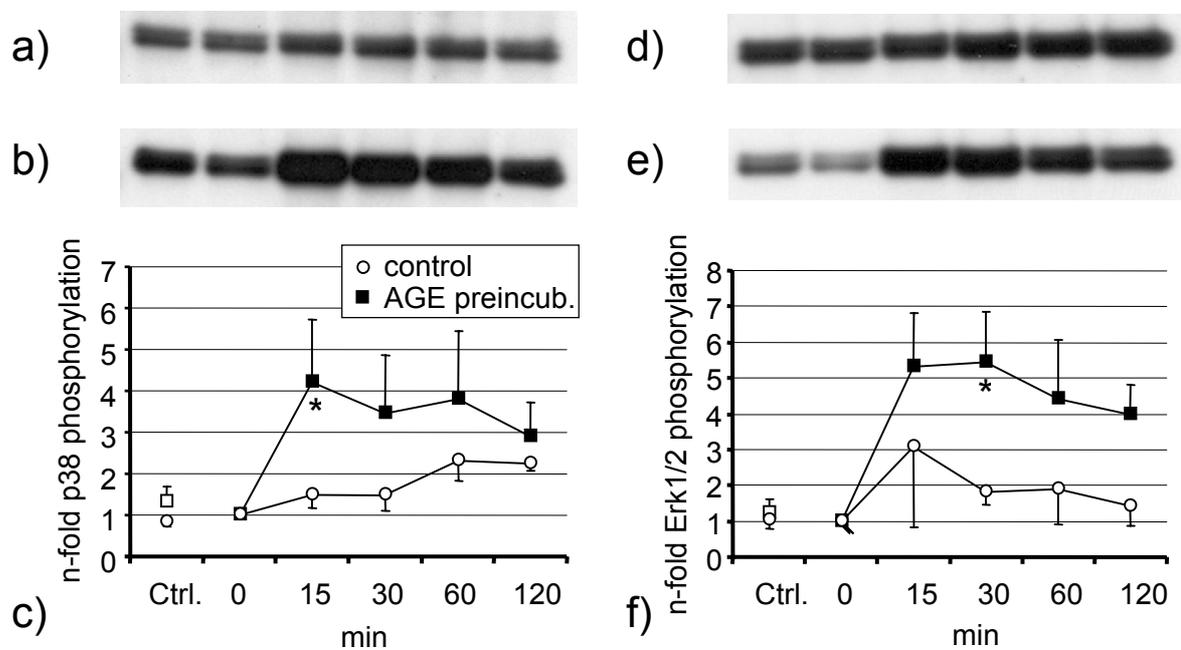


Abbildung 4.7: Westernblots von Zellextrakten aus HUVEC mit dem Nachweis der MAP-Kinasen p38 (a-c) und ERK1/2 (d-f). Repräsentative Westernblots aus Stimulationen unter AGE-Präinkubation. Oberste Reihe (a, d) jeweils Nachweis der Gesamtexpression von p38 (a) und ERK1/2 (d). Darunter Nachweis der jeweils aktivierten Form von p38 (b) und ERK1/2 (e) mit phosphospezifischen Antikörpern (b, e). Quantitative Auswertung nach Normalisierung des Signals des phosphospezifischen Antikörpers gegen die Gesamt-MAP-Kinase. Die Intensität zum Zeitpunkt 0 min wurde als 1 festgesetzt. * $p < 0,05$.

4.4.4 NF- κ B unter S100A8/S100A9

Als distales Zielprotein der hier untersuchten RAGE-assoziierten Signaltransduktion ist seit langem NF κ B definiert. Dabei reguliert NF κ B als nukleärer Transkriptionsfaktor die Aktivierung verschiedener proinflammatorischer Proteine, darunter auch die oben untersuchten.

Abbildung 4.6 zeigt die Induktion von NF κ B unter AGE/S100 A8/A9 Stimulation, sowie unter Verwendung der oben beschriebenen Inhibitoren. Die Inhibition S100A8/A9 abhängiger Induktion von NF κ B durch PD 98059 und SB 203580 entspricht den Befunden unter 4.4.2, wo NF κ B abhängige proinflammatorische Proteine vermehrt exprimiert wurden. Auch hier zeigte sich ein additiver Effekt unter der gleichzeitigen Inhibition von p38 und ERK1/2.

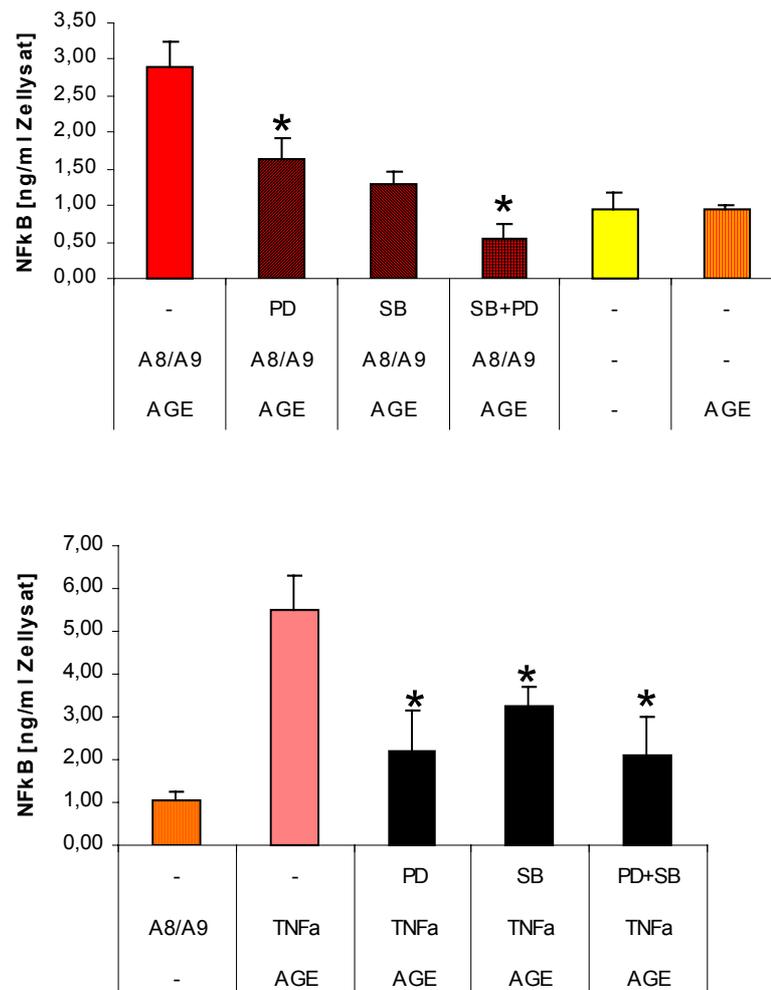


Abbildung 4.8: Unter Einfluß der Inhibitoren zeigte sich eine signifikante (* p<0,05) Senkung der NFκ-B Konzentration im Zellysat. n=4

5 Diskussion

Die pathophysiologischen Vorstellungen zur Atheroskleroseentstehung haben sich im letzten Jahrzehnt erheblich gewandelt. Gegenwärtig sehen wir die Atherosklerose in erster Linie als typische chronisch-entzündliche Erkrankung an (Ross, 1999). Eine zentrale Rolle in diesem chronisch inflammatorischen Prozeß stellt die dem Rezeptor für AGE (RAGE) nachgeschaltete Signaltransduktionskaskade dar, die vermutlich insbesondere unter den pathophysiologischen Bedingungen eines Diabetes mellitus oder der terminalen Niereninsuffizienz eine besondere Bedeutung für die bei diesen Patienten oft schweren atherosklerotischen Veränderungen hat (Bierhaus et al., 1998). Denn bei diesen Erkrankungen kommt es zu einer Überladung des Organismus mit AGEs (Bierhaus et al., 2001), welche Glykierungs- und Oxidationsprodukte von verschiedensten Proteinen sind und bei diesen Erkrankungen entweder vermehrt produziert werden bzw. nicht ausreichend eliminiert werden können. Die dem Rezeptor RAGE nachgeschaltete Signaltransduktionskaskade führt dann zu einer perpetuierten Aktivierung von NF κ B (Bierhaus et al., 1997), welche von den Mitogen aktivierte Protein-Kinasen (MAPK) p38 und ERK1/2 (p44/p42) abhängig ist (Yeh et al., 2001). Das Besondere an dieser Kaskade ist es, daß es im Gegensatz zu anderen Signaltransduktionsmechanismen nicht zu einer negativen Gegenregulation kommt, sondern diese Kaskade eigene positiv regulatorische Wege aktiviert, die zu einer Amplifikation der inflammatorischen Signale führen kann (Schmidt et al., 2001).

S100-Proteine spielen bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen eine wichtige Rolle, insbesondere durch ihre chemotaktischen und adhäsionsfördernden Eigenschaften. Neuere Veröffentlichungen ergaben Hinweise darauf, daß zumindest einzelne Vertreter dieser Proteinfamilie mit RAGE interagieren (Hofmann et al., 1999; (Huttunen et al., 2000) und zu einer Aktivierung der nachgeschalteten Signaltransduktionskaskade führen. Derartige Beobachtungen haben dazu geführt, daß das sogenannte "*two hit*"-Modell (Schmidt et al., 2001) postuliert wurde, welches besagt, daß neben einer chronischen Aktivierung der RAGE-Kaskade durch AGEs als ersten Schritt, weitere Faktoren wie oxidativer Streß oder proinflammatorische Stimuli als "*second hit*" zur Auslösung einer überschießenden Inflammationsantwort erforderlich sind. Somit hatte diese Arbeit das Ziel am Modell der Endothelzellkultur die Interaktion zwischen AGEs und den inflammatorischen S100-Proteinen S100A8 und S100A9 zu untersuchen.

5.1 Effekte von AGE an humanen Endothelzellen

Durch eine dreitägige Stimulation mit AGE-Albumin konnte zunächst auch für das Modell der humanen Endothelzelle (HUVEC) eine positive Regulation des Rezeptors für AGE (RAGE) gezeigt werden. Aus verschiedenen Tiermodellen, aber auch histopathologischen Untersuchungen zum Diabetes mellitus und chronischer Niereninsuffizienz, ist es bekannt, daß eine chronische AGE-Überladung zu einer vermehrten Expression von RAGE führt (Greten et al., 1996) (Hori et al., 1996). Dies trifft auch für die hier im Vergleich zu in vivo Versuchen relativ kurze Beobachtungszeit von nur 3 Tagen, in der bei AGE-stimulierten Endothelzellen bereits eine deutlich gesteigerte RAGE Expression zu beobachten war. Interessanterweise waren verschiedene S100-Proteine alleine nicht in der Lage die Expression von RAGE zu steigern, obwohl einige Vertreter dieser Gruppe bekannte RAGE-Liganden sind. Ähnliche Beobachtungen konnten für die Gerinnungsaktivierung durch stimulierte Endothelzellen gemacht werden, welche ein indirektes Maß für die Aktivität und Expression des Gewebefaktors (*Tissue factor*) ist (Bierhaus et al., 1997). Auch hier hatte nur AGE einen gerinnungsaktivierenden Effekt. Dabei ist anzumerken, daß mit 1 mg/l AGE im Kulturüberstand im Vergleich zu anderen in vitro Versuchen, in denen Konzentrationen bis zu 600 mg/l verwendet wurden (Basta et al., 2002), eine vergleichsweise niedrige Konzentration von AGE gewählt wurde. Daß dennoch bereits mit niedrigen Konzentrationen diese Auswirkung auf RAGE zu beobachten waren, unterstreicht die Sensibilität der Expressionsregulation von RAGE für AGEs. Die Steigerung der Expression von RAGE durch AGE-Stimulation scheint bereits ein wichtiger Schritt für die frühe Phase der Atheroskleroseentstehung zu sein, da gezeigt werden konnte, daß durch die Gabe eines löslichen AGE-Rezeptors (sRAGE) die Entstehung von atherosklerotischen Plaques im Modell der ApoE Knockout Maus drastisch vermindert werden konnte (Park et al., 1998), sowie bei bereits manifester Atherosklerose die bestehende vaskuläre Hyperpermeabilität senkt (Wautier et al., 1996).

5.2 Effekte von S100A8/S100A9 in Abhängigkeit einer AGE-Vorstimulation

Die S100-Proteine S100A8 und S100A9 sind als proinflammatorische, sowie Kalzium- und Zink-bindende Proteine bekannt, die insbesondere durch ihre chemotaktischen Eigenschaften eine wichtige Rolle bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen spielen. So eignen sich die Serumspiegel dieser Proteine als klinische Marker für die Aktivität dieser Erkrankungen. So war es zunächst überraschend, daß das Heterodimer aus beiden Proteinen keine Effekte auf die Sekretion des Zytokins IL-6 durch Endothelzellen

hatte. Ausschließlich in AGE vorstimulierten Zellen kam es durch S100A8/S100A9 zu einer deutlichen Expressionssteigerung von IL-6 sowie der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1. Studien zeigen, daß gerade diese beiden Adhäsionsmoleküle einen wichtigen Marker bereits für die endotheliale Dysfunktion als Frühmanifestation der Atherosklerose darstellen (Schmidt et al., 1996). Diese Effekte ließen sich weder durch andere S100-Proteine wie S100A1 und S100B, andere EF-Hand kalziumbindende Proteine wie Calmodulin, noch durch die homodimerischen Isoformen aus jeweils S100A8 bzw. S100A9 reproduzieren. Auch aus anderen Arbeiten ist bekannt, daß insbesondere das Heterodimer aus S100A8 und S100A9 für die bekannten proinflammatorischen Effekte dieser Proteine verantwortlich zu sein scheint (Ryckman et al., 2003). Auch für andere S100-Proteine ist bekannt, daß sie unter physiologischen Bedingungen bevorzugt Dimere miteinander ausbilden. S100A8 und S100A9 bilden insbesondere bei physiologischen Kalziumspiegeln fast ausschließlich Heterodimere miteinander (Teigelkamp et al., 1991). Dieses Heterodimer scheint besondere Eigenschaften zu besitzen, die durch die Homodimere nicht wiedergegeben werden können. Zu diesen gehört zum Beispiel die Eigenschaft Arachidonsäure mit hoher Affinität zu binden (Klempt et al., 1997), welches eine Voraussetzung für die Aufnahme dieser Vorstufe entzündlicher Mediatoren in Zellen darstellt (Kerkhoff et al., 2001). Auch innerhalb von Neutrophilen scheint die Komplexbildung von S100A8/S100A9 mit Arachidonsäure ein entscheidender Schritt für die Bildung entzündlicher Mediatoren zu sein (Roulin et al., 1999). Allerdings ist auch die Bildung größerer Komplexe in Form von Tri- und Tetrameren möglich. Inwiefern diese unterschiedlichen Komplexe eine besondere Bedeutung für die entzündlichen Eigenschaften dieser Proteine besitzen, ist bisher noch nicht geklärt.

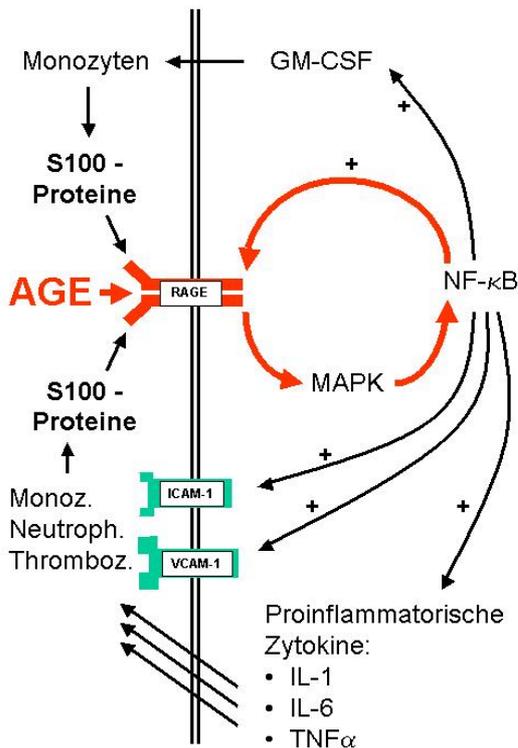


Abbildung 5.1 :

Positiver Feedback-Mechanismus zwischen NFκB und der RAGE-Aktivierung (rot). Nach Binden von AGE-Proteinen an ihren Rezeptor (RAGE) kommt es über eine MAPK vermittelte Aktivierung von NFκB zu einer direkten Aktivierung des RAGE Promotors, die in einer Aktivierung der RAGE Expression mündet. Gleichzeitig resultiert aus der Stimulation von RAGE eine nachhaltige Steigerung der Transkription von NFκBp65, so daß es zu einer Perpetuierung dieses Signaltransduktionsweges kommt. Es kann daraus geschlossen werden, daß es mittels einer NFκB-abhängigen Aktivierung von Monozyten und neutrophilen Granulozyten zu einer weiteren positiven Rückkoppelung kommt, da diese Zellpopulationen den proinflammatorischen RAGE-Liganden sezernieren. Diese multiplen Rückkoppelungsmechanismen könnten dann ursächlich einer chronisch perpetuierten inflammatorischen Reaktion des Endothels zugrundeliegen, die letztendlich bei Patienten mit Diabetes mellitus, terminaler Niereninsuffizienz oder Hypercholesterinämie in einer Atherosklerose mündet.

In einem zweiten Schritt wurde untersucht, ob auch die Stimulation mit heterodimerischem S100A8/S100A9 die bisher für die Effekte eine AGE-Stimulation bekannten Signaltransduktionswege aktiviert. Hierfür wurden weitgehend spezifische MAP-Kinase Inhibitoren verwendet: PD 98059 ist ein Inhibitor des ERK1/2-Aktivators MEK, SB 203580 ein Inhibitor von p38/JNK (Davies et al., 2000). Die hier erhobenen Daten zeigen, daß die mit RAGE-S100A8/S100A9 assoziierten Effekte durch eine Inhibition der MAP-Kinasen p38 und ERK1/2 vollständig blockierbar sind, während die jeweiligen Inhibitoren alleine nur eine partielle Blockade des Zytokinantwort bewirken. Dies ist möglicherweise auch darauf zurückzuführen, daß es innerhalb der einzelnen MAP-Kaskadewege zu sogenannten "Crosstalk" kommen kann, welches bedeutet, daß es Querverbindungen zwischen diesen Aktivierungswegen geben muß, die z.B. im Falle der Blockade eines Weges zu einer Kompensation über einen Alternativweg führen können (Sharma et al. 2003). Da verschiedene Proteinkinase-Inhibitoren auch unspezifische Effekte aufweisen, und zum Teil sogar auch eine Stimulation einzelner Kinasen verursachen können (Kalmes et al. 1999), wurde zur Bestätigung einer tatsächlichen Aktivierung ein Nachweis der Phosphorylierung der MAP-Kinasen p38 und ERK1/2 durchgeführt. Diese Versuche

zeigten, daß es zu einer raschen Aktivierung dieser Kinasen kommt, welche bereits nach 30 Minuten ein Maximum erreicht hat. Diese Versuche bestätigen, daß die durch S100A8/S100A9 ausgelöste Sekretion proinflammatorischer Proteine von beiden Kaskaden der MAP-Kinasen p38 und ERK1/2 abhängig ist.

Diese hier gezeigten Daten unterstützen somit erstmals die Hypothese, daß das Heterodimer der Ca^{2+} bindenden EF-Hand Proteine S100A8/S100A9 ein neues, bedeutendes proinflammatorisches Signalmolekül darstellt, das über eine RAGE-abhängige und nachhaltige Aktivierung von $\text{NF}\kappa\text{B}$ eine bedeutende Rolle in der Atheroskleroseentstehung spielen könnte. Diese Ergebnisse bieten somit erstmalig einen Ansatz für eine Erklärung, wie es im Rahmen des "Two Hit Models" zu einer perpetuierten inflammatorischen Reaktion am Endothel kommen kann, die letztendlich in einer progredienten Atherosklerose mündet. Allerdings kommen auch eine ganze Reihe weiterer Faktoren als "Second Hit" in Frage. So wirkt z.B. das als Entzündungsmarker bekannte C-reaktive Protein, welches durch IL-6 in der Leber induziert wird, selbst als proinflammatorischer Faktor (Pasceri et al., 2000). Aber auch oxidativer Stress (Cuda et al., 2002), bakterielle Toxine wie LPS (Wiedermann et al., 1999; (Takeuchi et al., 2000), inhalatives Zigaretterrauchen (Cerami et al., 1997), wie auch psychischer Streß (Bierhaus et al., 2003) sind weitere potentielle Faktoren. Die Tatsache, daß sich die Effekte der meisten dieser Noxen durch Statine günstig beeinflussen lassen, trägt mit zur Euphorie bei, welche die "*pleiotropen*" Effekte dieser Substanzklasse ausgelöst haben.

5.3 AGE-unabhängige Effekte von S100A8/S100A9

Nur im Hinblick auf das Chemokin MCP-1 konnte gezeigt werden, daß S100A8/S100A9 auch ohne AGE-Vorstimulation in der Lage ist, dessen Sekretion zu steigern. Bei den Versuchen zur Dosis-Wirkungs-Beziehung der S100A8/S100A9-Stimulation war dann aber auffällig, daß die Vorbehandlung der Endothelzellen mit AGEs eine Sensitivierung der MCP-1 Antwort auf S100A8/S100A9 bewirkte, so daß bereits niedrigere S100A8/S100A9-Konzentrationen eine größere MCP-1 Freisetzung bewirkten. MCP-1 spielt eine Schlüsselrolle für die Migration und Makrophageninfiltration der Gefäßintima, welche dann zur Bildung weicher, instabiler Plaques führt. Diese Infiltrate stellen einen histopathologischen Marker für das instabile atherosklerotische Plaque dar (Moreno et al., 1994). Auch die Bedeutung von MCP-1 für die Entstehung von Restenosen und myokardialem Remodeling konnte bereits mehrfach belegt werden (Mori et al., 2002) (Furukawa et al., 1999). Die Tatsache, daß es zu einer vermehrten Sekretion von MCP-1

auch ohne AGE-Vorstimulation kommt, zeigt, daß dieses Chemokin möglicherweise leicht auch durch andere inflammatorische Stimuli zu eine Potenzierung der Inflammationsantwort beitragen kann, zumal MCP-1 selbst ebenfalls in der Lage ist Zytokine zu induzieren (Werle et al., 2002).

Für die Entwicklung möglicher gentherapeutischer Ansätze zur Blockade der Wirkung von S100A8/S100A9 liefern bereits existierende Knockout-Modelle interessante Informationen. Während das S100A8-Knockout der Maus bereits in der frühen Embryonalphase letal ist (Passey et al., 1999), ist der Knockout von S100A9 in der Maus überlebensfähig. Allerdings weisen S100A9-Knockout Mäuse eine verminderte Expression von CD11b auf, welche zu einer beeinträchtigten Chemotaxis und somit einer erhöhten Infektanfälligkeit führt. Für die Überexpression von S100A8 oder S100A9 gibt es bisher noch keine Tiermodelle. Hingegen ist erst kürzlich beim Menschen ein Syndrom mit erhöhten Serumspiegeln von S100A8/S100A9 entdeckt worden (Sampson et al., 2002), welches zunächst als Krankheitsbild der Hyperzinkämie beschrieben worden war. Während der normale Zinkspiegel des menschlichen Körpers 11 bis 18 $\mu\text{mol/l}$ beträgt, haben diese Patienten einem Serumspiegel von 77 bis 200 $\mu\text{mol/l}$ Zink und weisen ferner eine Hepatosplenomegalie, eine Anämie, sowie Zeichen einer systemischen Inflammationsreaktion auf. Ursache des erhöhten Serumspiegels von Zink ist der deutlich erhöhter Serumspiegel von S100A8/S100A9 mit 1,4 bis 6,5 g/l. Da dieses Protein eine hohe Affinität für Zink hat, führt dies sekundär zu den erhöhten Zinkspiegeln. Der Normalbereich für S100A8/S100A9 liegt unter 1 mg/l. Diese Daten zeigen hier noch einmal deutlich auch die pathophysiologische Bedeutung des Heterodimers S100A8/S100A9 für entzündliche Erkrankungen.

5.4 Effekte von Statinen

Einen weiteren klinisch äußerst interessanten Ansatz zur Blockade der RAGE nachgeschalteten Signaltransduktionskaskade stellt die Gruppe der HMG-CoA-Reduktasehemmer (Statine) dar (siehe Abbildung 5.2). Arbeiten der letzten Jahre zeigen, daß die pharmakologische Wirkung dieser Stoffgruppe nicht nur in einer ausschließlichen Verringerung der Serumlipide zu sehen ist. Über eine Inhibition von p²¹ras sind Statine in der Lage einer NFκB Aktivierung entgegen zu wirken (Ortego et al., 1999; (Denoyelle et al., 2001). Ferner ist diese Stoffgruppe offensichtlich dazu in der Lage über eine Blockade der Rho GTPase eine verstärkte NO-Synthese zu bewirken (Laufs et al., 1998) und die Leukozyten-Endothel-Interaktion zu vermindern (Scalia et al., 2001). Letzteres ist unter dem Aspekt besonders interessant, daß S100A8 und S100A9 durch eine Wirkung auf Neutrophile deren Adhäsion am Endothel fördern. Unter den in-vitro Versuchsbedingungen zeigt sich auch, daß die dem Zellkulturmedium zugegebene Substanz Simvastatin in einer Konzentration von 10 µM die proinflammatorischen Effekte von S100A8/S100A9 zumindest teilweise reduzieren konnte. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, daß insbesondere auch Diabetiker von einer frühzeitigen Therapie mit Statinen besonders stark profitieren, da es bei diesen durch eine chronische AGE-Überladung zu einer andauernden Stimulation der RAGE-Kaskade kommt. Zudem sind bereits verschiedene Polymorphismen von RAGE gefunden worden, die sowohl mit akzelerierten atherosklerotischen Veränderungen, aber auch der Progression einer diabetischen Nephropathie assoziiert sind (Hudson et al., 2001). Insbesondere diese Polymorphismen scheinen an einer differenzierten Regulation der RAGE vermittelten Zellaktivierung beteiligt zu sein. Somit könnten bestimmte Rezeptorpolymorphismen bei Patienten mit Diabetes mellitus Prädiktoren für spätere atherosklerotische Komplikationen sein, welche eine frühzeitige und intensive Primärprävention erforderlich machen.

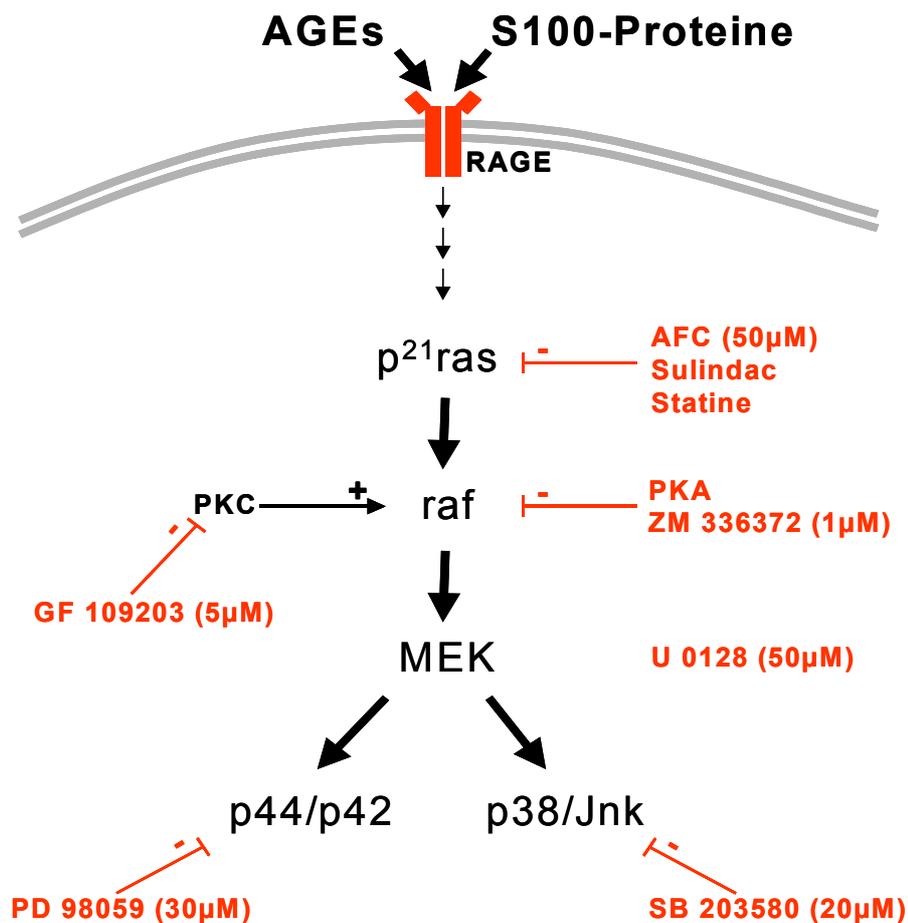


Abbildung 5.2 : Schematische Darstellung des RAGE Signaltransduktionswegs und dessen pharmakologischen Inhibitionsmöglichkeiten. Die Aktivierung mündet in einer vermehrten Expression von NFκB.

Neben einer frühzeitigen Therapie mit Statinen ergeben sich möglicherweise zukünftig auch weitere Optionen einer direkten Beeinflussung der RAGE-abhängigen Inflammation. Da Tierversuche mit sogenanntem löslichen RAGE (sRAGE), welches die extrazelluläre Domäne von RAGE darstellt, spektakuläre Effekte auf die Atherosklerose der Maus ergeben haben (Park et al., 1998), gibt es derzeit Bemühungen ein Pharmakon mit ähnlicher AGE-blockierender Wirkung herzustellen. Aber auch die Elimination von AGE-Proteinen durch sogenannte AGE-Breaker (Vasan et al., 1996; (Kass et al., 2001; (Candido et al., 2003) stellt eine weitere therapeutische Alternative dar. Da S100A8 und S100A9 für viele physiologische Prozesse eine wichtige Rolle spielen, müssen Versuche zur Blockade der Wirkung beider Proteine zunächst noch ergeben, ob dies zu einer Reduktion atherosklerotischer Veränderungen oder als unerwünschten Effekt zu einer erhöhten Infektanfälligkeit führt.

6 Zusammenfassung

Die Atherosklerose ist eine entzündliche Erkrankung. Bislang ist jedoch, wie auch für andere chronisch-inflammatorische Erkrankungen noch unklar, welche Mechanismen zur Perpetuierung der systemischen Entzündungsreaktionen führen. Tierversuche legen allerdings nahe, daß RAGE- und NFκB-abhängige Signaltransduktionsprozesse hier eine wesentliche Rolle spielen. In der vorliegenden Dissertation sollte daher untersucht werden, inwiefern die kalziumbindenden Proteine S100A8 und S100A9 als neues proinflammatorisches Signalprotein über eine Aktivierung der RAGE/MAPK/NF-κB-abhängigen Signaltransduktion die endotheliale Inflammationsreaktion initiieren kann.

S100A8 (MRP-8) und S100A9 (MRP-14), werden beide in neutrophilen Granulozyten und Monozyten exprimiert und nach Stimulation dieser Zellen als Heterodimere in das Serumkompartiment freigesetzt. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen erstmals, daß das Heterodimer S100A8/S100A9 am Model der humanen Endothelzelle über die Aktivierung von MAP-Kinasen und NF-κB die Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Adhäsionsmolekülen initiiert. Dieser Effekt ist spezifisch für das Heterodimer aus beiden Proteinen, da der Effekt weder mit den homodimerischen Isoformen noch mit anderen S100-Proteinen beobachtet werden konnte, und ist von einer vorhergehenden AGE-Stimulation abhängig. Während nach alleiniger Stimulation der Endothelzellen mit dem Heterodimer S100A8/S100A9 keine Effekte zu dokumentieren waren, führte S100A8/S100A9 zu einer starken Expression von IL-6, VCAM-1, ICAM-1 und MCP-1, sofern zuvor die RAGE-Expression auf Endothelzellen durch eine 72 stündige Vorinkubation mit AGE-Albumin gesteigert worden war. In Versuchen mit spezifischen Inhibitoren von MAP-Kinasen konnte gezeigt werden, daß ERK1/2 und p38 abhängige Signaltransduktionswege für die Wirkung von S100A8/S100A9 verantwortlich sind und einem möglichen therapeutischen Ansatz bieten. Daß auch die Substanz Simvastatin die S100A8/S100A9-Effekte abschwächen konnte, ist eine weitere Erklärung für die in klinischen Studien beobachteten pleiotropen Effekte dieser Substanzgruppe.

Die Daten dieser Arbeit unterstützen daher erstmals die Hypothese, daß das Heterodimer der EF-Hand Ca²⁺-bindenden Proteine S100A8/S100A9 ein bedeutendes proinflammatorisches Signalmolekül darstellt, welches über eine RAGE-abhängige und nachhaltige Aktivierung von NFκB eine bedeutende Rolle in der Atheroskleroseentstehung spielen könnte.

7 Abkürzungsverzeichnis

AGE	Advanced glycation end products
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BSA	Rinderserumalbumin
CaBP	kalziumbindende Proteine
CM	Calmodulin
DAG	Diacylglycerin
ddH ₂ O	doppelt entsalztes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylen-diamino-tetraessigsäure
EF-Hand	Strukturprinzip von Ca ²⁺ bindenden Proteine einer Helix-Schleife-Helix-Einheit. Siehe auch Einleitung.
EGTA	1,2-Bis(2-aminoethoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FCS	fetal calf serum
GLU	Glucose
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HUVEC	human umbilical vein cells
IL-6	Interleukin 6
KO	Kontrolle
LPS	Lipopolysaccharid
MCP	macrophage chemotactic protein
MRP	macrophage migration inhibitory factor - related protein
MIF	human macrophage migration inhibitory factor
MRP	macrophage migration inhibitory factor - related protein
NFκB	nukleärer Transkriptionsfaktor kappa B
NIF	neutrophil immobilizing factor
NS	Nabelschnur
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAGE	Rezeptor für AGE
SDS	Sodiumdodecylsulfat

TBS	Trisgepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylen-diamine
TNF- α	Tumor Nekrosefaktor Alpha
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

8 Literatur

- Barger SW, Wolchok SR and Van Eldik LJ (1992): Disulfide-linked S100 beta dimers and signal transduction. *Biochim Biophys Acta* 1160(1): 105-12.
- Basta G, Lazzerini G, Massaro M, Simoncini T, Tanganelli P, Fu C, Kislinger T, Stern DM, Schmidt AM and De Caterina R (2002): Advanced glycation end products activate endothelium through signal- transduction receptor RAGE: a mechanism for amplification of inflammatory responses. *Circulation* 105(7): 816-22.
- Bhardwaj RS, Zotz C, Zwadlo-Klarwasser G, Roth J, Goebeler M, Mahnke K, Falk M, Meinardus-Hager G and Sorg C (1992): The calcium-binding proteins MRP8 and MRP14 form a membrane-associated heterodimer in a subset of monocytes/macrophages present in acute but absent in chronic inflammatory lesions. *Eur J Immunol* 22(7): 1891-7.
- Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R and Nawroth PP (1998): AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovasc Res* 37(3): 586-600.
- Bierhaus A, Illmer T, Kasper M, Luther T, Quehenberger P, Tritschler H, Wahl P, Ziegler R, Muller M and Nawroth PP (1997): Advanced glycation end product (AGE)-mediated induction of tissue factor in cultured endothelial cells is dependent on RAGE. *Circulation* 96(7): 2262-71.
- Bierhaus A, Illmer T, Kasper M, Luther T, Quehenberger P, Tritschler H, Wahl P, Ziegler R, Muller M and Nawroth PP (1997): Advanced Glycation End Product (AGE)-Mediated Induction of Tissue Factor in Cultured Endothelial Cells Is Dependent on RAGE. *Circulation* 96(7): 2262-2271.
- Bierhaus A, Schiekofer S, Schwaninger M, Andrassy M, Humpert PM, Chen J, Hong M, Luther T, Henle T, Kloting I, Morcos M, Hofmann M, Tritschler H, Weigle B, Kasper M, Smith M, Perry G, Schmidt AM, Stern DM, Haring HU, Schleicher E and Nawroth PP (2001): Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *Diabetes* 50(12): 2792-808.

- Bierhaus A, Wolf J, Andrassy M, Rohleder N, Humpert PM, Petrov D, Ferstl R, von Eynatten M, Wendt T, Rudofsky G, Joswig M, Morcos M, Schwaninger M, McEwen B, Kirschbaum C and Nawroth PP (2003): A mechanism converting psychosocial stress into mononuclear cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(4): 1920-5.
- Bierhaus A, Ziegler R and Nawroth PP (1998): Molecular mechanisms of diabetic angiopathy--clues for innovative therapeutic interventions. *Horm Res* 50(Suppl 1): 1-5.
- Bruggen J, Tarcsay L, Cerletti N, Odink K, Rutishauser M, Hollander G and Sorg C (1988): The molecular nature of the cystic fibrosis antigen. *Nature* 331(6157): 570.
- Bucciarelli LG, Wendt T, Qu W, Lu Y, Lalla E, Rong LL, Goova MT, Moser B, Kislinger T, Lee DC, Kashyap Y, Stern DM and Schmidt AM (2002): RAGE blockade stabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice. *Circulation* 106(22): 2827-35.
- Burkhardt K, Radespiel-Troger M, Rupprecht HD, Goppelt-Struebe M, Riess R, Renders L, Hauser IA and Kunzendorf U (2001): An increase in myeloid-related protein serum levels precedes acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 12(9): 1947-57.
- Candido R, Forbes JM, Thomas MC, Thallas V, Dean RG, Burns WC, Tikellis C, Ritchie RH, Twigg SM, Cooper ME and Burrell LM (2003): A breaker of advanced glycation end products attenuates diabetes- induced myocardial structural changes. *Circ Res* 92(7): 785-92.
- Cerami C, Founds H, Nicholl I, Mitsuhashi T, Giordano D, Vanpatten S, Lee A, Al-Abed Y, Vlassara H, Bucala R and Cerami A (1997): Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(25): 13915-20.
- Cornish CJ, Devery JM, Poronnik P, Lackmann M, Cook DI and Geczy CL (1996): S100 protein CP-10 stimulates myeloid cell chemotaxis without activation. *J Cell Physiol* 166(2): 427-37.

- Davies SP, Reddy H, Caivano M and Cohen P (2000): Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 351(Pt 1): 95-105.
- Denoyelle C, Vasse M, Korner M, Mishal Z, Ganne F, Vannier JP, Soria J and Soria C (2001): Cerivastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, inhibits the signaling pathways involved in the invasiveness and metastatic properties of highly invasive breast cancer cell lines: an in vitro study. *Carcinogenesis* 22(8): 1139-48.
- Devery JM, King NJ and Geczy CL (1994): Acute inflammatory activity of the S100 protein CP-10. Activation of neutrophils in vivo and in vitro. *J Immunol* 152(4): 1888-97.
- Dorin JR, Novak M, Hill RE, Brock DJ, Secher DS and van Heyningen V (1987): A clue to the basic defect in cystic fibrosis from cloning the CF antigen gene. *Nature* 326(6113): 614-7.
- Frosch M, Strey A, Vogl T, Wulffraat NM, Kuis W, Sunderkötter C, Harms E, Sorg C and Roth J (2000): 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* 43(3): 628-37.
- Furukawa Y, Matsumori A, Ohashi N, Shioi T, Ono K, Harada A, Matsushima K and Sasayama S (1999): Anti-Monocyte Chemoattractant Protein-1/Monocyte Chemotactic and Activating Factor Antibody Inhibits Neointimal Hyperplasia in Injured Rat Carotid Arteries. *Circ Res* 84(3): 306-314.
- Greten J, Kreis I, Wiesel K, Stier E, Schmidt AM, Stern DM, Ritz E, Waldherr R and Nawroth PP (1996): Receptors for advanced glycation end-products (AGE) - expression by endothelial cells in non-diabetic uraemic patients. *Nephrol Dial Transplant* 11(5): 786-90.
- Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, Avila C, Kambham N, Bierhaus A, Nawroth P, Neurath MF, Slattery T, Beach D, McClary J, Nagashima M, Morser J, Stern D and Schmidt AM (1999): RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 97(7): 889-901.

- Hori O, Yan SD, Ogawa S, Kuwabara K, Matsumoto M, Stern D and Schmidt AM (1996): The receptor for advanced glycation end-products has a central role in mediating the effects of advanced glycation end-products on the development of vascular disease in diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant* 11(Suppl 5): 13-6.
- Hudson BI, Stickland MH, Futers TS and Grant PJ (2001): Effects of novel polymorphisms in the RAGE gene on transcriptional regulation and their association with diabetic retinopathy. *Diabetes* 50(6): 1505-11.
- Hunter MJ and Chazin WJ (1998): High level expression and dimer characterization of the S100 EF-hand proteins, migration inhibitory factor-related proteins 8 and 14. *J Biol Chem* 273(20): 12427-35.
- Huttunen HJ, Kuja-Panula J, Sorci G, Agneletti AL, Donato R and Rauvala H (2000): Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J Biol Chem* 275(51): 40096-105.
- Jaffe et al. (1973) Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins :identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 52(11): 2745-2756
- Kalmes A, Deou J, Clowes AW, Daum G. Raf-1 is activated by the p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, SB203580. *FEBS Lett.* 1999 Feb 5;444(1):71-4.
- Kass DA, Shapiro EP, Kawaguchi M, Capriotti AR, Scuteri A, deGroof RC and Lakatta EG (2001): Improved arterial compliance by a novel advanced glycation end-product crosslink breaker. *Circulation* 104(13): 1464-70.
- Kerkhoff C, Sorg C, Tandon NN and Nacken W (2001): Interaction of S100A8/S100A9-arachidonic acid complexes with the scavenger receptor CD36 may facilitate fatty acid uptake by endothelial cells. *Biochemistry* 40(1): 241-8.

- Kislinger T, Tanji N, Wendt T, Qu W, Lu Y, Ferran LJ, Jr., Taguchi A, Olson K, Bucciarelli L, Goova M, Hofmann MA, Cataldegirmen G, D'Agati V, Pischetsrieder M, Stern DM and Schmidt AM (2001): 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* 21(6): 905-10.
- Klempt M, Melkonyan H, Nacken W, Wiesmann D, Holtkemper U and Sorg C (1997): The heterodimer of the Ca²⁺-binding proteins MRP8 and MRP14 binds to arachidonic acid. *FEBS Lett* 408(1): 81-4.
- Kothe H, Dalhoff K, Rupp J, Muller A, Kreuzer J, Maass M and Katus HA (2000): Hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors modify the inflammatory response of human macrophages and endothelial cells infected with *Chlamydia pneumoniae*. *Circulation* 101(15): 1760-3.
- Kunz M, Roth J, Sorg C and Kolde G (1992): Epidermal expression of the calcium binding surface antigen 27E10 in inflammatory skin diseases. *Arch Dermatol Res* 284(7): 386-90.
- Lagasse E and Clerc RG (1988): Cloning and expression of two human genes encoding calcium-binding proteins that are regulated during myeloid differentiation. *Mol Cell Biol* 8(6): 2402-10.
- Lau W, Devery JM and Geczy CL (1995): A chemotactic S100 peptide enhances scavenger receptor and Mac-1 expression and cholesteryl ester accumulation in murine peritoneal macrophages in vivo. *J Clin Invest* 95(5): 1957-65.
- Laufs U, La Fata V, Plutzky J and Liao JK (1998): Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 97(12): 1129-35.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent.
J Biol Chem 193, 254-275 (1951)
- Lugering N, Stoll R, Kucharzik T, Burmeister G, Sorg C and Domschke W (1995): Serum 27E10 antigen: a new potential marker for staging HIV disease. *Clin Exp Immunol* 101(2): 249-53.

- Lugering N, Stoll R, Kucharzik T, Schmid KW, Rohlmann G, Burmeister G, Sorg C and Domschke W (1995): Immunohistochemical distribution and serum levels of the Ca(2+)-binding proteins MRP8, MRP14 and their heterodimeric form MRP8/14 in Crohn's disease. *Digestion* 56(5): 406-14.
- Lugering N, Stoll R, Schmid KW, Kucharzik T, Stein H, Burmeister G, Sorg C and Domschke W (1995): The myeloid related protein MRP8/14 (27E10 antigen)--usefulness as a potential marker for disease activity in ulcerative colitis and putative biological function. *Eur J Clin Invest* 25(9): 659-64.
- Matsumori A, Furukawa Y, Hashimoto T, Yoshida A, Ono K, Shioi T, Okada M, Iwasaki A, Nishio R, Matsushima K and Sasayama S (1997): Plasma levels of the monocyte chemotactic and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1 are elevated in patients with acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 29(1): 419-23.
- Moreno PR, Falk E, Palacios IF, Newell JB, Fuster V and Fallon JT (1994): Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture. *Circulation* 90(2): 775-8.
- Mori E, Komori K, Yamaoka T, Tani M, Kataoka C, Takeshita A, Usui M, Egashira K and Sugimachi K (2002): Essential role of monocyte chemoattractant protein-1 in development of restenotic changes (neointimal hyperplasia and constrictive remodeling) after balloon angioplasty in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation* 105(24): 2905-10.
- Newton RA and Hogg N (1998): The human S100 protein MRP-14 is a novel activator of the beta 2 integrin Mac-1 on neutrophils. *J Immunol* 160(3): 1427-35.
- Oakley BR, Kirsch DR and Morris NR (1980): A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 105(2): 361-3.
- Odink K, Cerletti N, Bruggen J, Clerc RG, Tarcsay L, Zwadlo G, Gerhards G, Schlegel R and Sorg C (1987): Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis. *Nature* 330(6143): 80-2.

- Ortego M, Bustos C, Hernandez-Presa MA, Tunon J, Diaz C, Hernandez G and Egido J (1999): Atorvastatin reduces NF-kappaB activation and chemokine expression in vascular smooth muscle cells and mononuclear cells. *Atherosclerosis* 147(2): 253-61.
- Park L, Raman KG, Lee KJ, Lu Y, Ferran LJ, Jr., Chow WS, Stern D and Schmidt AM (1998): Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nat Med* 4(9): 1025-31.
- Passey RJ, Williams E, Lichanska AM, Wells C, Hu S, Geczy CL, Little MH and Hume DA (1999): A null mutation in the inflammation-associated S100 protein S100A8 causes early resorption of the mouse embryo. *J Immunol* 163(4): 2209-16.
- Raj DS, Choudhury D, Welbourne TC, Levi M (2000): AGE: a nephrologists perspective. *Am J Kidney Dis* 35; 365-380
- Rammes A, Roth J, Goebeler M, Klempt M, Hartmann M and Sorg C (1997): 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* 272(14): 9496-502.
- Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE and Rifai N (2000): C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 342(12): 836-43.
- Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ and Hennekens CH (2000): Plasma Concentration of Interleukin-6 and the Risk of Future Myocardial Infarction Among Apparently Healthy Men. *Circulation* 101(15): 1767-1772.
- Ross R (1999): Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340(2): 115-26.
- Ryckman C, Robichaud GA, Roy J, Cantin R, Tremblay MJ and Tessier PA (2002): HIV-1 transcription and virus production are both accentuated by the proinflammatory myeloid-related proteins in human CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* 169(6): 3307-13.

- Sampson B, Fagerhol MK, Sunderkötter C, Golden BE, Richmond P, Klein N, Kovar IZ, Beattie JH, Wolska-Kusnierz B, Saito Y and Roth J (2002): Hyperzincaemia and hypercalprotectinaemia: a new disorder of zinc metabolism. *Lancet* 360(9347): 1742-5.
- Scalia R, Gooszen ME, Jones SP, Hoffmeyer M, Rimmer DM, 3rd, Trocha SD, Huang PL, Smith MB, Lefer AM and Lefer DJ (2001): Simvastatin exerts both anti-inflammatory and cardioprotective effects in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 103(21): 2598-603.
- Schafer BW and Heizmann CW (1996): The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci* 21(4): 134-40.
- Schafer BW, Wicki R, Engelkamp D, Mattei MG and Heizmann CW (1995): 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* 25(3): 638-43.
- Schluesener HJ, Kreamsner PG and Meyermann R (1998): Widespread expression of MRP8 and MRP14 in human cerebral malaria by microglial cells. *Acta Neuropathol (Berl)* 96(6): 575-80.
- Schmidt AM, Crandall J, Hori O, Cao R and Lakatta E (1996): Elevated plasma levels of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in diabetic patients with microalbuminuria: a marker of vascular dysfunction and progressive vascular disease. *Br J Haematol* 92(3): 747-50.
- Schmidt AM, Weidman E, Lalla E, Yan SD, Hori O, Cao R, Brett JG and Lamster IB (1996): Advanced glycation endproducts (AGEs) induce oxidant stress in the gingiva: a potential mechanism underlying accelerated periodontal disease associated with diabetes. *J Periodontal Res* 31(7): 508-15.
- Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL and Stern D (1999): Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res* 84(5): 489-97.

- Schmidt AM, Yan SD, Yan SF and Stern DM (2000): The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands. *Biochim Biophys Acta* 1498(2-3): 99-111.
- Schmidt AM, Yan SD, Yan SF and Stern DM (2001): The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest* 108(7): 949-55.
- Schreiber E, Matthias P, Muller MM and Schaffner W (1989): Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 17(15): 6419.
- Sharma GD, He J, Bazan HE. Epub 2003 Mar 26. p38 and ERK1/2 coordinate cellular migration and proliferation in epithelial wound healing: evidence of cross-talk activation between MAP kinase cascades. *J Biol Chem.* 2003 Jun 13;278(24):21989-97.
- Siegenthaler G, Roulin K, Chatellard-Gruaz D, Hotz R, Saurat JH, Hellman U and Hagens G (1997): A heterocomplex formed by the calcium-binding proteins MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9) binds unsaturated fatty acids with high affinity. *J Biol Chem* 272(14): 9371-7.
- Stary HC (1989): Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. *Arteriosclerosis* 9(1 Suppl): I19-32.
- Stitt AW, He C and Vlassara H (1999): Characterization of the advanced glycation end-product receptor complex in human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 256(3): 549-56.
- Stulik J, Osterreicher J, Koupilova K, Knizek, Macela A, Bures J, Jandik P, Langr F, Dedic K and Jungblut PR (1999): The analysis of S100A9 and S100A8 expression in matched sets of macroscopically normal colon mucosa and colorectal carcinoma: the S100A9 and S100A8 positive cells underlie and invade tumor mass. *Electrophoresis* 20(4-5): 1047-54. [pii].

- Teigelkamp S, Bhardwaj RS, Roth J, Meinardus-Hager G, Karas M and Sorg C (1991): Calcium-dependent complex assembly of the myeloid differentiation proteins MRP-8 and MRP-14. *J Biol Chem* 266(20): 13462-7.
- Vasan S, Zhang X, Kapurniotu A, Bernhagen J, Teichberg S, Basgen J, Wagle D, Shih D, Terlecky I, Bucala R, Cerami A, Egan J and Ulrich P (1996): An agent cleaving glucose-derived protein crosslinks in vitro and in vivo. *Nature* 382(6588): 275-8.
- Wautier JL, Zoukourian C, Chappey O, Wautier MP, Guillausseau PJ, Cao R, Hori O, Stern D and Schmidt AM (1996): Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy. Soluble receptor for advanced glycation end products blocks hyperpermeability in diabetic rats. *J Clin Invest* 97(1): 238-43.
- Werle M, Schmal U, Hanna K and Kreuzer J (2002): MCP-1 induces activation of MAP-kinases ERK, JNK and p38 MAPK in human endothelial cells. *Cardiovasc Res* 56(2): 284-92.
- Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A, Slattery T, Zhao L, Nagashima M, Morser J, Migheli A, Nawroth P, Stern D and Schmidt AM (1996): RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 382(6593): 685-91.
- Yeh CH, Sturgis L, Haidacher J, Zhang XN, Sherwood SJ, Bjercke RJ, Juhasz O, Crow MT, Tilton RG and Denner L (2001): Requirement for p38 and p44/p42 mitogen-activated protein kinases in RAGE-mediated nuclear factor-kappaB transcriptional activation and cytokine secretion. *Diabetes* 50(6): 1495-504.

9 Danksagung

Ich danke **Herrn PD Dr. med. A Remppis**, sowie **Herrn Prof. Dr. med. H.A. Katus** für die freundliche Überlassung des Themas, sowie für eine fundierte Ausbildung in der wissenschaftlich, experimentellen Forschung.

Mein besonderer Dank gilt **Herrn Dr. med. P. Ehlermann** der für diese Arbeit mit großer Geduld Pate stand und mich jederzeit mit Rat und Tat unterstützt hat.

Herrn Dr. med. P. Most danke ich für zahlreiche Kritiken und Anregungen.

Frau Dr. sci. hum. A. Bierhaus aus der Medizinischen Abteilung 1 der Universität Heidelberg möchte ich für zahlreiche methodische und inhaltliche Hilfestellungen Danken, ohne die diese Arbeit sicherlich „einige Klippen weniger umsegeln“ musste .

Frau Dr. rer. nat. A. Müller danke ich für die Anleitung und Hilfestellung bei der Durchführung des hier angewendeten NF κ B ELISA.

Mein größter Dank gilt jedoch meiner Familie, besonders meinen Eltern die mir dieses Studium, und damit eine Promotion, erst ermöglicht haben und mir auch während des ganzen Studiums stets zur Seite standen.

10 Lebenslauf

Name	Eggers	
Vornamen	Kai	
Geburtsdatum	04. Oktober 1976	
Geburtsort	Berlin-Steglitz	
Eltern	John Herrman Eggers , Diplom- Ingenieur Christiane Eggers , geb. Muschiol, Technische Zeichnerin	
Geschwister	Britta Eggers	
Familienstand	ledig	
Schulbildung	3.05.1996	Abitur an der Wichernschule in Hamburg
Studium	seit 10.1997	Humanmedizin an der Universität Lübeck
	30.03.2000	Ärztliche Vorprüfung
	23.03.2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	11.04.2003	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Famulaturen	07.2000-08.2000	Innere Medizin, Praxis Dr. Köhnhorn, Hamburg
	08.2000-09.2000	Anästhesiologie und Intensivmedizin , Universität Lübeck
	07.2001-10.2001	Innere Medizin - Kardiologie, Universität Lübeck
Praktisches Jahr	04.2003-08.2003	Anästhesiologie und Intensivmedizin , Krankenhaus Süd, Lübeck
	08.2003-12.2003	Medizinische Klinik, Krankenhaus Süd, Lübeck
	12.2003-03.2004	Klinik für Chirurgie, Krankenhaus Süd, Lübeck