

Universitätsklinikum Ulm
Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Vinzenz Hombach

Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-Genpolymorphismus bei Diabetikern und Prädiabetikern: Von einer bevölkerungsbasierten Studie zur möglichen funktionellen Relevanz. Ergebnisse der KORA S2000 Studie.

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

vorgelegt von
Mahir Karakas
Blaubeuren
2009

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Koenig

2. Berichterstatter: PD Dr. Christa Meisinger

Tag der Promotion: 21. Januar 2010

meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
1.1. Atherosklerose und Diabetes mellitus	1
1.2. AGE und RAGE.....	4
1.3. Der RAGE (Gly82Ser) Genpolymorphismus	7
1.4. Monozyten, S100 und Zytokine	9
1.5. Fragestellung.....	10
2. Material und Methoden	11
2.1. Material.....	11
2.2. Epidemiologische Studie.....	15
2.3. Experimentelle Studie	19
2.4. Statistik	23
3. Ergebnisse	25
3.1. Epidemiologische Studie.....	25
3.2. Experimentelle Studie	33
4. Diskussion	37
4.1. Assoziation zwischen dem RAGE Genotyp und T2DM sowie IGT	37
4.2. Assoziation zwischen dem RAGE Genotyp und den kardiometabolischen Risikofaktoren sowie systemischen Markern der Inflammation	39
4.3. Der RAGE GA-Genotyp und die Amplifikation der zellulären Perturbation im proinflammatorischen Umfeld	40
5. Zusammenfassung.....	43
6. Literaturverzeichnis	45

7. Appendix	57
7.1. Blutabnahme-Protokoll	57
7.2. Übereignungsvertrag	58
8. Danksagung	60
9. Lebenslauf	61

Abkürzungsverzeichnis

AGE	Advanced glycation end product
AMI	Akuter Myokardinfarkt
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
BMI	Body-mass-index
CHO	Chinesische Hamster-Ovarzellen
CI	Konfidenzintervall
CML	Carboxymethyllysin
Co	Kontrolle
CRP	C-reaktives Protein
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DM	Diabetes mellitus
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FGF	Fibroblast growth factor
G	Glycin
Gly	Glycin
Hb	Hämoglobin
HBSS	Hanks balanced salt solution
HDL	High density lipoprotein
HMGB	High-mobility group box
HOMA-IR	Insulin-Resistance Score
HRP	Horse radish peroxidase
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IGT	Gestörte Glukosetoleranz
IL	Interleukin
IRMA	Immunoradiometric assay
kDa	Kilo-Dalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
KORA	Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg

L	Liter
LDL	Low density lipoprotein
Lp-PLA ₂	Lipoprotein-associated phospholipase A2
LPS	Lipopolysaccharid
m	Männlich
MCP	Monocyte chemoattractant protein
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MI	Myokardinfarkt
MIP-1 α	Macrophage inflammatory protein-1-alpha
MMP	Matrixmetalloproteinase
n	Fallzahl
NO	Stickstoffmonoxid
NF κ B	Nuclear factor kappa B
OGTT	Oraler Glukosetoleranz-Test
OR	Odds ratio
ox-LDL	Oxidiertes LDL
p	Signifikanzniveau
PAI-1	Plasminogen-Aktivator Inhibitor-1
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor
PH	Potentia hydrogenii (Maßeinheit für die Konzentration von Wasserstoffionen)
PMA	Phorbol myristate acetate
P/S	Penicillin/ Streptomycin
RAGE	Receptor for advanced glycation end products
RPM	Umdrehungen pro Minute
s	Soluble
sTNF-R	löslicher Tumornekrosefaktor-alpha-Rezeptor
SAA	Serum-Amyloid A
SAS	Statistical Analysis System
SBE	Single-Base-Extension

SD	Standardabweichung
S	Serin
Ser	Serin
SNP	Single nucleotide polymorphism
SR-A	Scavenger-Rezeptor-A
T2DM	Typ 2 Diabetes mellitus
TBS	Tris-buffered saline
TF	Tissue factor
TGF- β	Transforming growth factor-beta
TLR	Toll-like receptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
T2DM	Typ 2 Diabetes mellitus
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VLA	Very late antigen
vs	Versus
w	Weiblich
WHO	Weltgesundheitsorganisation

1. Einleitung

1.1. Atherosklerose und Diabetes mellitus

Sowohl der Typ 1 Diabetes mellitus (DM), als auch der Typ 2 DM (T2DM) stellen einen starken und unabhängigen Risikofaktor für die Atheroskleroseentstehung und ihre Komplikationen dar (Beckman et al 2002; Marx und Blessing 2007).

Der Durchbruch in der Bewertung des DM als Hochrisikosituation für kardiovaskuläre Komplikationen wie Myokardinfarkt (MI) und Apoplex war durch die Ergebnisse einer großen bevölkerungsbasierten Studie aus Finnland erreicht worden, in der nach multivariabler Adjustierung nachgewiesen werden konnte, dass Diabetiker ohne MI das Infarktrisiko von nicht diabetischen Reinfarktpatienten haben und DM somit ein Äquivalent der koronaren Herzkrankheit (KHK) darstellt (Haffner et al. 1998). Überdies ist bekannt, dass der akute Myokardinfarkt bei Diabetikern mit einer höheren Letalität einhergeht (Löwel et al. 2000).

Die Atherosklerose ist ein chronischer entzündlicher Prozess in der Gefäßwand, der über Jahre verläuft und durch eine Akkumulation von Makrophagen, Lipiden und fibrösen Elementen in den Arterien gekennzeichnet ist (Libby et al. 2002; Ross 1999).

Das erhöhte Risiko für das Auftreten einer Atherosklerose beruht bei Diabetikern auf einer komplexen metabolischen Störung mit Hyperglykämie, Insulinresistenz, Dyslipidämie, Alteration des Gerinnungssystems und endothelialer Dysfunktion (Ray et al. 2009).

Die endotheliale Dysfunktion, eine Störung der funktionalen Integrität des Endothels, die mit einer erhöhten Permeabilität einhergeht, ist das initiale Stadium der Atherogenese. Dies führt dazu, dass Lipoproteine, etwa das low density lipoprotein (LDL), in die Gefäßwand insudieren (Napoli et al. 1997), subendothelial akkumulieren, und mittels Oxidation modifiziert werden (Witztum und Steinberg 2001). Apolipoprotein B100 (apo B-100), der wesentliche Proteinbestandteil des LDL, spielt hierbei als Ligand der rezeptorvermittelten Aufnahme des LDL aus dem zirkulierenden Blut eine wichtige Rolle, und gilt als unabhängiger Risikofaktor

der KHK (Meisinger et al. 2005). Die spezifischen Eigenschaften des oxidierten LDL sind abhängig vom Ausmaß der Modifikation, welche von einer geringen Modifikation bis hin zu einer umfassenden Oxidation, sogenanntes oxidiertes LDL (ox-LDL), reichen kann. Das ox-LDL stimuliert die Endothelzellen zur Freisetzung von zellulären Adhäsionsmolekülen, etwa intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular adhesion molecule-1 (VCAM-1), E-Selektin und Wachstumsfaktoren wie den Macrophages Colony-Stimulating factor (M-CSF). M-CSF führt zu einer Adhäsion von Monozyten an das Endothel und ihrer Einwanderung in die Gefäßwand. Neuere Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass einige Chemokine, wie beispielsweise Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1) und Interleukin-8 (IL-8), über eine Interaktion mit Adhäsionsmolekülen einen direkten Einfluss auf die Einwanderung der Monozyten in die Gefäßwand haben (Gerszten et al. 1999; Gu et al. 1998; Herder et al. 2006). Die bei Diabetikern in vermehrtem Ausmaß gebildeten „advanced glycation end products“ (AGEs) verstärken die Monozyten-Adhäsion, indem sie eine vermehrte Bildung von MCP-1 in humanen Endothelzellen bewirken (Schmidt und Stern 2000). Ferner wird die Thrombogenität der Zellen in Diabetikern durch eine vermehrte Expression von Gewebsthromboplastin (Tissue factor, TF) auf zirkulierenden Monozyten gesteigert (Bierhaus et al. 1997; Ichikawa et al. 1998; Khechai et al. 1997). TF ist ein integrales Membranglykoprotein, das durch Bindung und proteolytische Spaltung von Faktor VII und Faktor VIIa zur Aktivierung der extrinsischen Gerinnungskaskade führt. Dies induziert die Akkumulation von Fibrin in der Gefäßwand, was eine Hyperkoagulabilität zur Folge hat (Ichikawa et al. 1996; Wilcox et al. 1989). Durch Fibrin und seine Abbauprodukte wird zudem die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten stimuliert, zwei wichtigen Komponenten der atherosklerotischen Läsion (Ishida und Tanaka 1982; Smith 1986).

Der initiale Schritt in der Adhäsion ist das „Rollen“ des Monozyten entlang der endothelialen Oberfläche, welches unter anderem durch P- und E-Selektine vermittelt wird. Die Adhäsion selbst wird durch das Integrin very late antigen-4 (VLA-4) gesteuert, welches mit VCAM interagiert (Shih et al. 1999). Anschließend transmigrieren die Monozyten in die Intima, wo sie unter Stimulation mit MCP-1, M-CSF und transforming growth factor- β (TGF- β) proliferieren und in Makrophagen differenzieren. Die Makrophagen nehmen ox-LDL welches durch

Myeloperoxidasen, Sphingomyelinasen und sekretorischer Phospholipasen modifiziert wurde, mittels sogenannter Scavenger-Rezeptoren-A (SR-A oder CD36) auf. Durch die Aufnahme des ox-LDL verwandeln sich die Zellen in lipidspeichernde Schaumzellen. Dieser Differenzierungsprozess und die kontinuierliche Anreicherung in der Intima gemeinsam mit T-Zellen führen zu der ersten ubiquitären Läsion der Atherosklerose, der sogenannten Fatty-Streak-Formation in der Gefäßwand. Durch weitere Lipidansammlung, Apoptose und verstärkte proteolytische Aktivität kommt es zur Ausbildung eines nekrotischen Lipidkerns in der Plaque, und es entstehen fortgeschrittene Läsionen. Darüber hinaus werden Monozyten, Makrophagen und Schaumzellen aktiviert. Sie sezernieren vermehrt Produkte die das Endothel schädigen und den atherosklerotischen Prozess beschleunigen. Durch Interleukine und den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) werden die Monozyten-Adhäsion und die Chemotaxis gesteigert, wodurch noch mehr zirkulierende Monozyten in die atherosklerotische Läsion rekrutiert werden. Überdies führen Wachstumsfaktoren, die von T-Zellen und Monozyten freigesetzt werden –etwa platelet-derived growth factor (PDGF), TGF- β und diverse Zytokine (z.B. TNF- α , IL-1 und IL-6) zur erhöhten Produktion von extrazellulärer Matrix und dazu, dass glatte Gefäßmuskelzellen aus ihrer ursprünglichen Umgebung, der Tunica media, in die Tunica intima einwandern und proliferieren (Marx et al. 2003; Raines und Ross 1993). Darüber hinaus führen die freigesetzten Zytokine zur Aktivierung anderer Gefäßwandzellen, wodurch der Prozess der Leukozytenrekrutierung und Plaqueentwicklung weiter fortschreitet (Hansson 2005).

Eine schützende fibröse Kappe aus glatten Gefäßmuskelzellen und extrazellulärer Matrix trennt den nekrotischen Lipidkern vom zirkulierenden Blut. Diese stabile Plaque kann in eine instabile Plaque übergehen, die durch einen ausgedehnten nekrotischen Lipidkern, eine große Anzahl von Schaumzellen und eine dünne fibröse Kappe gekennzeichnet ist (Libby 2001). Durch die Freisetzung matrixdegradierender Enzyme, etwa Matrixmetalloproteinase (MMPs), durch Makrophagen und Schaumzellen und durch die gleichzeitige verminderte Synthese von Kollagen und Elastin wird die Stabilität der fibrösen Kappe vermindert (Libby et al 1998). Diese Prozesse werden u.a. durch Zytokine reguliert (Amento et al. 1991).

Die atherosklerotischen Läsionen von Patienten mit T2DM weisen im Vergleich zu Nichtdiabetikern einige pathohistologische Besonderheiten auf, welche die Fragilität und Thrombogenität der Läsion erhöhen: Bezüglich der Plaquekomposition ist der nekrotische Lipidanteil bei Diabetikern wesentlich höher als bei Nichtdiabetikern. Ferner enthalten die Plaques diabetischer Patienten mehr Makrophagen und Schaumzellen. Da diese Zellen durch die Freisetzung von MMPs in entscheidendem Maß zur Ausdünnung der schützenden fibrösen Kappe der Plaque beitragen, gilt dies ebenfalls als Charakteristikum einer instabilen Plaque (Marx et al. 2003a). Ein besonders charakteristischer Befund beim Diabetiker sind erhöhte Plasmaspiegel des Plasminogen-Aktivator Inhibitor-1 (PAI-1) (Juhan-Vague und Alessi 1997). PAI-1 wirkt nicht allein systemisch, sondern kann auch lokal im Bereich der atherosklerotischen Plaque schädliche Effekte entfalten, indem es MMPs aktiviert und so zur Plaqueinstabilität beiträgt.

Klinisch kann diese fortgeschrittene atherosklerotische Läsion durch die progrediente Einengung des Gefäßlumens ischämische Symptome verursachen. Verändert sich die Beschaffenheit der Oberfläche der fibrösen Kappe, etwa durch Ulzeration oder Ruptur der Plaque, so kann dies zur Entstehung eines Thrombus führen, was akute kardiovaskuläre Ereignisse bis hin zum akuten Myokardinfarkt zur Folge haben kann (Libby 2001).

1.2. AGE und RAGE

Die bei T2DM anfallenden Glykierungsprodukte (AGEs) führen über die Interaktion mit dem Rezeptor für advanced glycation end products (RAGE) zu einer Aktivierung von Nuclear Factor kappa B (NFκB) –abhängigen proinflammatorischen Signaltransduktionsmechanismen, wodurch die Entstehung und die Progression atherosklerotischer Läsionen verstärkt werden (Schmidt et al. 1999).

Die Bedeutung der AGE/RAGE Interaktion im atherosklerotischen Prozess konnte anhand eines Mausmodells gezeigt werden. In ApoE-Knockout Mäusen mit Streptozotocin-induziertem Diabetes führte die Unterbrechung der AGE/RAGE

Interaktion durch Gabe eines löslichen AGE-Rezeptors (sRAGE) zu einer signifikanten Verminderung der atherosklerotischen Läsionen. Der beobachtete Effekt war unabhängig vom Glukose- und Lipid-Spiegel (Park et al. 1998). Im Stadium der fortgeschrittenen Atherosklerose wirkt die RAGE-Blockade durch die Stabilisierung atherosklerotischer Plaques protektiv (Bucciarelli et al. 2002).

AGEs entstehen in der sog. Browning- oder Maillard-Reaktion durch eine nicht-enzymatische Reaktion von reduzierenden Zuckern in der offenen Aldehydform mit freien Aminogruppen in Makromolekülen (v.a. Proteinen (Njoroge und Monnier 1989), Lipiden (Bucala et al. 1993) und Nukleinsäuren (Bucala et al. 1984)). Die zunächst entstehenden frühen Glykierungsprodukte, sog. Schiff'sche Basen, werden spontan in die stabileren, aber noch reversiblen Amadoriprodukte umgewandelt. Glykiertes Hämoglobin (HbA1c) ist der bekannteste Vertreter der Amadoriprodukte. Die weitere molekulare Modifikation der Amadoriprodukte, bestärkt durch kontinuierlich hohe Glukose-Spiegel, schafft irreversible AGEs, die Protease-resistent sind (Brownlee et al. 1988; Fu et al. 1994). Die Anhäufung von AGEs wird nicht nur beim physiologischen Alterungsprozess beobachtet, sondern im verstärktem Ausmaß auch bei Patienten mit T2DM, chronischer Niereninsuffizienz, Amyloidose und Morbus Alzheimer (Nawroth et al. 1999; Wu 1993). Obwohl AGEs eine große Anzahl chemischer Strukturen aufweisen, überwiegen *in vivo* die Derivate des N^ε-(carboxymethyl)lysine-protein (CML) (Reddy et al. 1995). CML reichert sich in Arterien, atherosklerotischen Plaques und Schaumzellen an (Friedman 1999).

Die Mechanismen die zu einer Gewebsschädigung durch AGEs führen sind noch nicht vollständig aufgeklärt. AGEs beschleunigen den atherosklerotischen Prozess direkt, i.e. Rezeptor-unabhängig, und indirekt, i.e. Rezeptor-vermittelt. Direkte AGE-induzierte Schäden der Gefäßwände und der ihr anliegenden Basalmembran entstehen durch die Ausbildung von starren Querverbindungen zwischen Kollagenmolekülen, durch die Einlagerung von LDL ins Subendothel und durch die vermehrte Synthese von extrazellulärer Matrix. Dies führt zu einem Elastizitätsverlust und zu einer Verengung des Gefäßlumens (Bierhaus et al. 1998; Rumble et al. 1997). Ferner werden durch die nichtenzymatische Glykierung der angiogenetisch wirkende fibroblast growth factor (FGF) und das vasodilatativ wirkende Stickstoffmonoxid (NO) in ihren Funktion beeinträchtigt (Bucala et al.

1991; Duraisamy et al. 2001). Überdies induzieren AGEs Rezeptor-unabhängig das vasokonstriktorisch wirkende Endothelin-1 (Quehenberger et al. 2000).

AGEs können an verschiedene Zelloberflächenrezeptoren binden, etwa die Makrophagen Scavenger Rezeptoren Typ I und Typ II, wobei bisher nur die Bindung an den spezifischen Rezeptor RAGE und die dadurch vermittelten intrazellulären Signalmechanismen grundlegend untersucht worden sind (Ohgami et al. 2001; Schmidt und Stern 2000). Als RAGE-Liganden sind neben AGE auch Amphotericin und Amyloid-beta identifiziert worden. Letzteres spielt eine Rolle in der Pathogenese des Morbus Alzheimer (Yan et al. 1996). Überdies dient RAGE, neben dem Toll-like receptor 2 (TLR2), als Rezeptor für die high-mobility group box 1 (HMGB1), einem nukleären Protein, das bei Zellnekrose freigesetzt wird, was eine proinflammatorische Antwort hervorgerufen, wodurch letztendlich die Rekrutierung von endothelialen Progenitorzellen in ischämisches Gewebe stimuliert wird (Chavakis et al. 2007).

RAGE, der zur Gruppe der Immunglobulin-Superfamilie gehört und dessen Gen auf Chromosom 6 zwischen MHC-2 und MHC-3 lokalisiert ist, ist ein 35-kD Protein, das aus einer extrazellulären Domäne, einer transmembranen Domäne und einem kurzen zytosolischen Rest besteht. Die extrazelluläre Domäne besteht aus einer V-Typ-Region die kritisch für die Bindung von Liganden ist und zwei C-Typ-Regionen die ihre Bedeutung in der RAGE-medierten intrazellulären Signalkaskade haben (Neeper et al. 1992). Exprimiert wird RAGE auf niedrigem Niveau auf Endothelzellen, Gefäßmuskelzellen, mononukleären Zellen, T-Lymphozyten, Mesangialzellen und Neuronen (Brett et al. 1993). Bei Diabetikern kommt es nach Bindung von Liganden zu einer Hochregulation des Rezeptors (Schmidt et al. 2001).

Nach Bindung von AGE an RAGE kommt es zur MAP-Kinase-abhängigen Aktivierung von NFκB, was zur Expression von proinflammatorischen und prokoagulatorischen Genen führt (Baeuerle 1991; Bierhaus et al. 1997a; Bierhaus et al. 1997b). Hierzu gehören Interleukin-6 (IL-6), IL-1α, TNF-α, genauso wie Adhäsionsmoleküle, etwa VCAM-1, sowie TF. Dies bedingt neben einer akzelerierten Atherosklerose und einer gesteigerten prokoagulatorischen Aktivität die Induktion von oxidativem Stress. Überdies kommt es in glatten Muskelzellen zur gesteigerten zellulären Proliferation (Esposito et al. 1989; Schmidt et al. 1994a; Schmidt et al. 1994b; Vlassara et al. 1994).

Zur Erklärung der vaskulären Dysfunktion bei T2DM wird ein „Two-hit model“ propagiert. Diese Theorie geht davon aus, dass es in AGE-reicher Umgebung, etwa bei T2DM oder bei terminaler Niereninsuffizienz, in einem ersten Schritt zunächst zu einer AGE/RAGE Interaktion und damit zur chronischen Präaktivierung des Rezeptors kommt. Erst durch einen zweiten Stimulus, etwa die Einlagerung von oxLDL, eine Infektion oder eine Ischämie, kommt es zu einer überschießenden inflammatorischen Antwort und zur akzelerierten Atherosklerose (Schmidt et al. 1999).

Andere Arbeiten haben gezeigt, dass RAGE ein Multiligand-Rezeptor ist, und dass neben AGEs auch die proinflammatorischen Zytokine der S100-Familie in die RAGE vermittelte Aktivierung der MAP-Kinasen eingebunden sind (Hofmann et al. 1999). S100-Proteine kommen in verschiedenen Geweben vor, wo sie an der Regulation von Zellzyklus, Zelldifferenzierung und an verschiedenen Signaltransduktionswegen beteiligt sind. S100 spielt als Sekretionsprodukt neutrophiler Granulozyten und Makrophagen eine wichtige positiv regulatorische Rolle in der Entwicklung chronisch inflammatorischer Prozesse (Lagasse und Clerc 1988). S100 bindet an RAGE auf proinflammatorischen Zellen und bewirkt dadurch die nukleäre Translokation von NFκB und über die Aktivierung von MAP-Kinasen die Sekretion von Zytokinen (Bhardwaj et al. 1992).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei T2DM die verstärkte RAGE-Aktivierung in Kombination mit der komplexen metabolischen Störung die Atherosklerose akzeleriert, obwohl RAGE nicht mit der Insulinresistenz und den damit verbundenen Störungen des Glukosemetabolismus verbunden zu sein scheint.

1.3. Der RAGE Gly82Ser Genpolymorphismus

In den letzten Jahren hat sich die RAGE-Forschung zunehmend dem kodierenden Gen zugewandt, und es wurden mehrere Genpolymorphismen entdeckt (Hudson et al. 1998; Hudson et al. 2001; Poirier et al. 2001; Prevost et al. 1999). Unter den RAGE Polymorphismen zeigte ein funktioneller Basenaustausch –Serin (Ser, S)

für Glycin (Gly, G), am Codon 82 im Exon 3 des RAGE Gens die höchste Relevanz. Auffallend ist, dass dieser Polymorphismus in der V-Typ-Region der extrazellulären Domäne lokalisiert ist, welche kritisch für die Bindung der RAGE-Liganden ist. Zudem induziert der Austausch des Glycins durch Serin einen Wechsel der Polarität der extrazellulären Domäne. Dies könnte die Sekundärstruktur des Proteins verändern, wodurch wiederum die Bindungseigenschaften des Rezeptors beeinträchtigt werden (Prevost et al. 1999). In-vitro Studien wiesen für das seltenere 82 S Allel eine höhere Ligandenaffinität in transfizierten Zellen nach. In einem experimentellem Ansatz ergaben sich Hinweise für funktionelle Unterschiede zwischen beiden Allelen des Gly82Ser Genpolymorphismus (Hofmann et al. 2002). Diese Unterschiede betrafen die Ligandenbindung, die Signalaktivität und die Genexpression. In chinesischen Hamster-Ovarzellen (CHO) zeigte sich dass das 82 S Allel die größere Affinität zum Liganden besitzt. Zudem wies das 82 S Allel nach Interaktion mit S100 eine verstärkte Aktivierung der proinflammatorischen Signaltransduktionswege auf. Zur Überprüfung der funktionellen Bedeutung dieser Beobachtungen verwendeten die Autoren humane Monozyten die entweder das homozygote G82G Allel (n=5) oder das heterozygote G82S Allel (n=5) trugen. Die Monozyten mit dem RAGE 82G/82S-Allel wiesen eine amplifizierte zelluläre Antwort mit verstärkter Produktion von TNF- α , IL-6 und MMP-9 auf. Dabei unterschied sich der basale Spiegel dieser inflammatorischen Mediatoren zwischen beiden Allelen nicht. Der signifikante Unterschied trat erst nach Bindung der Liganden an die Rezeptoren auf. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde postuliert, dass der G82S Genpolymorphismus bei Vorliegen einer inflammatorischen Erkrankung aggravierend wirkt (Hofmann et al. 2002).

Trotz dieser Beobachtungen zeigte bisher kein Genpolymorphismus eine klare Assoziation mit mikro- und makrovaskulären Komplikationen des T2DM. Die Ergebnisse der bisher publizierten Studien konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Allelgruppen bezüglich der Komplikationen eines T2DM nachweisen (Hudson et al. 1998; Liu und Xiang 1999; Prevost et al. 1999; Pulkkinen et al. 2000). Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz zwischen den experimentellen Ergebnissen und den Ergebnissen der Fallstudien könnte in der geringen Anzahl der untersuchten Probanden liegen.

1.4. Monozyten, S100 und Zytokine

Monozyten und ihre Derivate besitzen sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Eigenschaften. Pro-inflammatorische Eigenschaften umfassen die Sekretion von Akute-Phase Proteinen, die Phagozytose extrazellulärer Mikroben, die Antigen-Verdauung und –Präsentation, die Lymphozyten-Stimulation, die zellvermittelte Zytotoxizität und die Angiogenese. Anti-inflammatorische Eigenschaften sind die Clearance von Gewebe-Debris, die Elaboration von Faktoren die die Inflammation hemmen, die Stimulation von Bindegeweben und die Angiogenese (Wilson et al. 2009).

Aktiviert Monozyten spielen sowohl bei der Atherogenese als auch bei der Destabilisierung von bereits bestehenden atherosklerotischen Plaques eine wichtige Rolle. Bei Diabetikern scheinen die Monozyten in einem hochaktiven Zustand zu sein. So finden sich in diesen Patienten mononukleäre Zellen, die dauerhaft aktiviertes NF κ B aufweisen, was auf die AGE-bedingte RAGE-Stimulation zurückführbar ist (Nawroth et al. 1999).

Die Rekrutierung der Monozyten in die Arterienwand ist eine der frühesten Stadien der Atherosklerose. In der Intima wandeln sich die Monozyten zu Makrophagen und produzieren wichtige Mediatoren der Inflammation. Sie sind für die Bildung diverser Zytokine verantwortlich, die über ihren Einfluss auf unterschiedliche Zellen der Gefäßwand zum inflammatorischen Prozess beitragen (Choudhury et al. 2005). Patienten mit T2DM weisen erhöhte Serumspiegel an TNF- α und Il-6 auf (Cavallo et al. 1991). Neben der Zytokinproduktion tragen Monozyten zur inflammatorischen Antwort durch die Bildung von freien Sauerstoff-Radikalen, Proteasen und Komplement-Faktoren bei. Die Aufnahme modifizierter Lipoproteine durch die Makrophagen führt zur Akkumulation von Cholesterolestern und die Bildung von Schaumzellen aus Makrophagen –ein entscheidender Schritt der Atherosklerose. Ferner tragen die Makrophagen durch die Sekretion von MMPs zum Remodeling der atherosklerotischen Läsion und zur Plaqueruptur bei (Cheng et al 2009; Johnson et al 2008; Newby 2008).

S100 Proteine werden von Monozyten in großer Menge exprimiert und machen 5% ihres zytosolischen Proteins aus (Lagasse und Clerc 1988). Nach Stimulation der Monozyten werden die S100 Proteine als Heterodimer in das Serumkompartiment freigesetzt (Rammes et al. 1997). Unter normalen

Bedingungen exprimieren gewebständige Makrophagen keine S100 Proteine, jedoch findet sich bei entzündlichen Erkrankungen eine besonders starke Expression an der Zelloberfläche aktivierter Makrophagen (Odink et al. 1987). Die Aktivierung der Monozyten und Makrophagen zeigt sich auch an der verstärkten Sekretion von TNF- α und Il-1 β im Vergleich zu S100-negativen Zellen (Bhardwaj et al. 1992). Wir verwendeten als AGE-Äquivalent in unseren Stimulationsversuchen durchgehend S100, da dessen Interaktion und Wirkung mit RAGE sehr ausführlich beschrieben ist.

1.5. Fragestellung

Wir wollten die Auswirkungen des RAGE Gly82Ser Polymorphismus auf die „cell responsiveness“ in einer großen Kohorte untersuchen. Zunächst bestimmten wir die Häufigkeit des G82S Polymorphismus (G/A, rs2070600) in einer süddeutschen Population mittleren Alters. Anschließend sollte die Hypothese überprüft werden, ob das 82 Ser Allel *ex-vivo* eine zelluläre Perturbation in einer pro-inflammatorischen Umgebung, etwa im diabetischen Millieu, mit gesteigerter S100 Akkumulation, verstärken kann.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Substanzen und Lösungen

Acrylamid	Biorad
APS 10%	Sigma-Aldrich
BenchMark Protein Ladder	Invitrogen
Bromphenolblau	Sigma Diagnostics
Buffycoat	Blutspendezentrale
β -Mercaptoethanol	Sigma Diagnostics
Chemoluminescent Substrate	Pierce
DNA-Polymerase	Qiagen
Ethidiumbromid	GibcoBRL
Filter Paper	BioRad
Glukose-Trinklösung	Boehringer
Glycerol	J.T. Baker
Glycin	Carl Roth GmbH & Co
HBSS	PAA Laboratories GmbH
Humanes Serum	PAA Laboratories GmbH
Hybond-C	Amersham Biosciences
<u>Laemli (5x)</u>	5 ml 0,5 M Tris pH 6,8 4 ml Glycerol 0,8 g SDS 0,5 ml β -Mercaptoethanol 125 mg Bromphenolblau ad 10 ml Aqua dest.
LPS	Boehringer
Lymphozyten Separationsmedium	PAA Laboratories GmbH
<u>Lysispuffer</u>	100 mM Tris, pH 7.4 100 mM NaCl 1 mM EDTA

	1 mM EGTA
	1 mM NaF
	20 mM NaP ₄ O ₇
	2 mM Na ₃ VO ₄
	1 % Triton X-100
	10 % Glycerol
	0.5 % Deoxycholat
	0,005 % Proteinaseinhibitoren
	1 mM PMSF
Massen-Spektrometer	Sequenom
<u>Medium Monozyten</u>	RPMI 1640
	10% humanes Serum
	1% Penicillin/ Streptomycin
Methanol	Merck
Micro BCA Protein Assay Kit	Pierce
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co
NaCl	Delta-Pharma
NP40	Sigma Diagnostics
Nuclon	Nuc A/S
PBS	PAA Laboratories GmbH
Penicillin/ Streptomycin	PAA Laboratories GmbH
Percoll	Sigma-Aldrich
PMA	Boehringer
PMSF	Sigma-Aldrich
Proteinaseinhibitoren	Boehringer
Puregene DANN Isolation Kit	Gentra Systems
PVDF-Membran	Millipore Corporation
Restore Western Blot Stripping Buffer	Pierce
RPMI 1640	PAA Laboratories GmbH
<u>Running Buffer (10%)</u>	30,3 g Tris Base
	141 g Glycin
	10 g SDS
	ad 1 l Aqua dest.
	PH 8,3

S-100, human	Calbiochem
<u>Samplegel 12%</u>	72 ml 30% Acrylamid
	59,04 ml Aqua dest.
	45 ml 1,5 M Tris pH 8,8
	1,8 ml 10% SDS
SDS	Carl Roth GmbH & Co
<u>Stackgel 5%</u>	15 ml 30% Acrylamid
	61,8 ml Aqua dest.
	11,25 ml 1,0 M Tris pH 8,8
	0,9 ml 10% SDS
<u>TBS</u>	20 mM Trizma Base
	150 mM NaCl
<u>TBST</u>	TBS
	0,05 % Tween 20
Temed	Sigma-Aldrich
TNF- α , human	R&D Systems
<u>Transfer Buffer (10x)</u>	30,3 g Tris Base
	112,6 g Glycin
	ad 1 l Aqua dest.
	PH 8,8
Trizma Base	USB
Tween 20	Sigma-Aldrich

2.1.2 Antikörper und ELISA

Anti-rabbit HRP	DAKO
Anti-p-p38 (Thr180/Tyr182)	Cell Signaling
Anti-p38 (Thr180/Tyr182)	Cell Signaling
IL-6 ELISA	R&D Systems
TNF- α -ELISA	R&D Systems

2.1.3 Geräte und Verbrauchsmaterial

Blotgerät	Biorad
Brutschrank	Heraeus
Chromatographiepapier	Whatman International
ELISA Reader	DPC
Glaspasteurpipetten	Magazin
Laminar Air Flow Bench	Heraeus
Leucosep-Isolationsröhrchen	Greiner Labortechnik
MassARRAY System	Sequenom
Mikroskop	Leica
Netzgerät	Biometra
Neubauerkammer	Brand
pH-Meter	WTW
Pipetten	Gilson
Power Supply EPS 600	Pharmacia
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße 15 ml und 50 ml	Becton Dickinson
Reaktionsplatten, 96 well	Greiner
Röntgenfilme	Fuji SuperRX
Röntgekassette	Rego
Western Blot Kammer	Biometrica
Zellkulturschalen 100 mm	Becton Dickinson
Zellschaber	Becton Dickinson
Zentrifugen	Sorvall RC-5B, Kendro Multifuge 3S-R, Kendro

2.2. Epidemiologische Studie

2.2.1. Studienpopulation und Studiendesign

Das KORA-Projekt (Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg) wurde zwischen Oktober 1999 und April 2001 in Augsburg durchgeführt, und umfasste 4261 Männer und Frauen zwischen 25 und 74 Jahren. Die Teilnehmerquote betrug 67 %. Die Studie wurde von dem GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit Neuherberg und der Abteilung Innere II der Medizinischen Klinik der Universität Ulm durchgeführt.

Die Basispopulation für die vorliegenden Analysen bestand aus 1485 Teilnehmern der KORA-S2000 Querschnitts-Studie im Alter von 55 – 74 Jahren. Die Studie umfasste in der Fallgruppe 254 Patienten mit T2DM und 353 Patienten mit IGT sowie in der Kontrollgruppe 878 Alters- und Geschlechts-gepaarte gesunde Probanden. Alle Teilnehmer nahmen an einem standardisiertem Interview teil, gefolgt von einer Blutentnahme für laborchemische Bestimmungen.

Alle Probanden wurden eingehend über das Forschungsprojekt aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis für die Genotypisierung. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der bayerischen Landesärztekammer genehmigt.

2.2.2. Fragebogen

Die Teilnehmer unserer Studie unterzogen sich einer Befragung durch geschulte Interviewer. Der Fragebogen umfasste soziodemografische Fragen, Fragen zu Vorerkrankungen, zu kardiovaskulären Risikofaktoren, zum Bildungsstatus, zur körperlichen Aktivität und zu Ernährungsgewohnheiten. Das Vorliegen einer KHK wurde über den speziell hierfür ausgearbeiteten Rose-Fragebogen und durch anamnestische Angaben zu einem früheren MI definiert (Rose et al. 1977). Eine Hypertonie wurde dann diagnostiziert, wenn der systolische Blutdruck ≥ 140 mmHg und/ oder der diastolische Blutdruckwert ≥ 90 mmHg betrug, oder wenn die Probanden angaben, antihypertensive Medikamente einzunehmen. Als Adipositas wurde ein Body-mass-index (BMI) ≥ 30 kg/m² definiert.

2.2.3. Orale Glukosetoleranz-Test

Alle Teilnehmer ohne bekannten T2DM unterzogen sich einem oralen Glukosetoleranz-Test (OGTT). Die Identifikation von Probanden mit einer IGT und einem neu-diagnostizierten T2DM erfolgte nach den Kriterien der Weltgesundheitsorganisation (WHO 1999). Der OGTT wurde in den Morgenstunden, zwischen 7:00 und 11:00 Uhr durchgeführt. Die Teilnehmer wurden gebeten 10 Stunden vor dem Test nüchtern zu bleiben, starke körperliche Anstrengung am Vortag des Tests zu meiden und bis zum Test-Ende nicht zu rauchen. Ausschlusskriterien für die Durchführung des OGTT waren: (1) eine antidiabetische Medikation oder ein bekannter T2DM; (2) eine akute Erkrankung; und (3) die Einnahme der Testsubstanz nach 11:00 Uhr. Für den OGTT wurde zunächst der Nüchtern-Glukosewert mittels venöser Blutentnahme bestimmt. Dann erfolgte die perorale Einnahme von 75 g Glukose, die in 250 ml Wasser gelöst wurde. Die Testflüssigkeit musste innerhalb von 5 Minuten getrunken werden. Nach 120 Minuten erfolgte die 2. Blutentnahme zur Glukosebestimmung. In unserer Studie betrug die Standard-Abweichung für die Bestimmung des 2-h-Glukosewertes 120 ± 6 min.

Von den 254 T2DM die an unserer Studie teilnahmen, waren 120 durch unsere Studie neu diagnostiziert worden und hatten bisher keine T2DM-Therapie erhalten. Ein T2DM wurde diagnostiziert bei Vorliegen eines Nüchtern-Glukosewertes $\geq 7,0$ mmol/l oder bei Vorliegen eines 2-h-Glukosewertes $\geq 11,1$ mmol/l. Eine IGT wurde entsprechend der diagnostischen Kriterien der WHO aus dem Jahre 1999 anhand des Nüchtern- und des 2-h-Glukosewertes bestimmt (WHO 1999).

2.2.4. Identifikation des RAGE Gly82Ser Genpolymorphismus

Der RAGE G82S Polymorphismus wurde mittels „Single Base Extension“ (SBE) identifiziert. Der SBE ging eine Polymerasekettenreaktion (PCR) voraus.

Per Puregene™ DNA Isolation Kit wurde aus weißen Blutzellen genomische DNA isoliert. Die Genotypisierung erfolgte mit dem MassARRAY System der Firma Sequenom. Das Reaktionsvolumen der PCR betrug 6 µl –5 ng genomische DNA und 167 nM eines jeden Primers. Die PCR bestand aus insgesamt 44 Zyklen und setzte sich wie folgt zusammen: Ein „hot start“ bei 95°C über 15 Minuten, Denaturierung bei 95°C über 30 Sekunden, „annealing“ bei 56°C über 30 Sekunden, Elongation bei 72°C für 1 Minute und anschließend die Inkubation über 10 Minuten bei 72°C. Die PCR-Produkte wurden zunächst bei 37°C für 20 Minuten mit alkalischer Phosphatase behandelt, um die überschüssigen Nukleotide zu entfernen und danach 10 Minuten auf 85°C erhitzt, um die alkalische Phosphatase zu inaktivieren.

Die Gesamtreaktion der SBE ist so konzipiert, dass der SBE-Primer nur um eine einzige Base, die komplementär zum interessierenden single-nucleotide-polymorphism (SNP) ist, verlängert wird. Dies geschieht, indem man dem Reaktionsansatz Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) statt Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs), wie bei der PCR, zusetzt. An ein ddNTP kann auf Grund seiner biochemischen Struktur keine weitere Base durch Polymerase angelagert werden. Die Elongationsphase, die analog zur PCR erfolgt, beschränkt sich also auf ein einziges Nukleotid. Mittels anschließender Messung im Massenspektrometer kann festgestellt werden, um welche Base der SBE-Primer verlängert wurde, da sich die vier Basen in ihrer Masse unterscheiden. Die entsprechend komplementäre Base entspricht dem gesuchten SNP-Typ.

Für die Base-Extension wurden die Primer in einer Konzentration von 5,4 µM in einem Reaktionsvolumen von 10 µl eingesetzt. Die SBE bestand aus insgesamt 40 Zyklen und setzte sich wie folgt zusammen: Ein „hot start“ bei 94°C über 2 Minuten, Denaturierung bei 94°C über 5 Sekunden, „annealing“ bei 52°C über 5 Sekunden und anschließend die Elongationsreaktion bei 72°C für 5 Sekunden.

2.2.5. Serumspiegel von Akute-Phase Proteinen, Zytokinen und Lipidparametern

Die Blutentnahmen wurden bei Probanden ohne T2DM und neu entdecktem T2DM in nüchternem Zustand durchgeführt und bei Probanden mit bekanntem T2DM im nicht-nüchternem Zustand. Alle Blutproben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Der Glukose-Spiegel wurde mittels der Hexokinase-Methode (Gluco-quant, Roche), und die HbA1c-Werte mittels eines turbodimetrischen immunologischen Assays bestimmt (Tina-quant, Roche). Gesamt-Cholesterin wurde mithilfe der enzymatischen Methode (CHOD-PAP, Roche), High-density lipoprotein- (HDL-) Cholesterin nach Präzipitation der apo B-enthaltenden Lipoproteine mit Phosphotungstat-Säure und Magnesiumdichlorid (Roche), und LDL-Cholesterin nach Präzipitation mit Dextransulfat (Quantolip LDL, Immuno AG) gemessen. Die Triglycerid-Messung erfolgte mit dem Boehringer GPO-PAP assay. Der Insulin-Resistance Score (HOMA-IR) wurde entsprechend der Formel: Nüchtern-Plasmaglukose (mmol/l) x Nüchtern-Seruminsulin (mU/l)/22,5 berechnet. Die CRP-Konzentration wurde, ebenso wie das SAA, Albumin und Fibrinogen, mit einem immunonephelometrischem Assay (Dade Behring, Marburg, Deutschland) gemessen. Das Detektionsniveau für CRP lag bei 0,17 mg/l. Die Serum-Konzentrationen der Zytokine und zirkulierenden Rezeptoren wurden mit diversen Sandwich-ELISA (löslicher Tumornekrosefaktor-alpha-Rezeptor (sTNF-R)60, sTNF-R80, Il-6R Bender MedSystems, Il-6, Serum-MCP-1, R&D Systems, Minneapolis, USA) bestimmt. Die Lp-PLA₂-Konzentrationen wurden mittels eines kommerziell erhältlichen ELISA (diaDexus, South San Francisco, USA) ermittelt. Alle Analysen wurden geblindet durchgeführt.

2.3. Experimentelle Studie

2.3.1. Studienpopulation und Studiendesign

Die Genotypisierung identifizierte 11 heterozygote (82Ser/Gly) Patienten mit T2DM, während keiner der Patienten mit T2DM homozygot für das RAGE 82Ser Allel war. Von diesen 11 heterozygoten Allelträgern mit T2DM wurden 5 männliche Probanden erneut in das Studienzentrum in Augsburg einbestellt. Ihnen wurden für die experimentellen Versuche 100 ml Blut entnommen. Die übrigen 6 Probanden erfüllten entweder die Einschlusskriterien nicht, oder die Kontaktaufnahme gelang nicht, oder sie lehnten eine weitere Teilnahme an der Studie ab. Als Kontrollgruppe für den experimentellen Teil der Studie dienten 5 Alters- und Geschlechts-gepaarte gesunde Probanden, die homozygot für das RAGE 82Gly Allel waren.

Für den experimentellen Arm der Studie wurden alle teilnehmenden Probanden erneut aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis für die Blutentnahme. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Universität Ulm genehmigt.

2.3.2. Isolation der Monozyten

Die Monozyten wurden mittels standardisierter sequentieller Dichtegradienten-Zentrifugation aus 100 ml heparinisiertem Vollblut isoliert, welches bis zur Verarbeitung bei 7°C gelagert wurde. Die Heparinisierung erfolgte in einer Konzentration von 50 IE/ 1 ml Blut. Die Isolation der Zellen wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt, um Kontaminationen zu vermeiden. Es wurden vier 50 ml Leucosep-Isolationsröhrchen mit Filterscheibe jeweils mit 15 ml Leukozytenseparationsmedium (LSM 1077) gefüllt und bei 2300 Umdrehungen pro Minute (RPM) über eine Minute abzentrifugiert. Je 25 ml Blut wurde auf die bereits vorbereiteten Isolationsröhrchen gegeben und bei 2500 RPM 10 Minuten lang zentrifugiert. Erythrozyten, Thrombozyten und Granulozyten hatten sich hiernach unter dem Filter angesammelt. Entsprechend ihrer Dichte befand sich über der Filterscheibe eine Schicht mononukleärer Zellen, die von Blutplasma

überlagert war. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und die aus mononukleären Zellen bestehende Bande mit der Pipette abgenommen. Die mononukleären Zellen aus den vier Reaktionsgefäßen wurden nun in zwei 50 ml Reaktionsgefäße überführt, anschließend in PBS gut resuspendiert und bei 1100 RPM zehn Minuten lang zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde verworfen und der Waschschrift wiederholt. Das dadurch erhaltene Pellet wurde dann in 3 mL PBS resuspendiert. 15 mL Hanks'balanced salt solution (HBSS) wurden per Titration auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt. Danach wurden in zwei 15 mL Reaktionsgefäße jeweils 7 mL „second separation solution“ und 3 mL mononukleäre Zellen gemischt. Die Zellen wurden bei 2000 RPM 30 Minuten lang mit einem Festwinkelrotor ohne Bremse zentrifugiert. Die Monozyten hatten sich dann als oberste Zellbande abgesetzt, wurden in ein 50 mL Gefäß überführt und nochmals mit PBS gewaschen. Das so erhaltene Monozytenpellet wurde in RPMI-1640 Medium (mit 0,5% hitze-inaktiviertem Medium und 1% P/S) resuspendiert. Die Reinheit der Monozyten wurde mittels Flow cytometry unter Verwendung eines PE-konjugierten anti-CD14 monoklonalen Antikörpers bestätigt.

Um die Zellzahl pro Milliliter Monozytensuspension zu ermitteln, wurden die Zellen in einer Neubauerkammer gezählt. Hierzu wurden 10 µL der Suspension entnommen und mit RPMI-1640 Medium verdünnt. 10 µL der Verdünnung wurden auf eine Neubauerzählkammer gegeben und die intakten Monozyten unter dem Mikroskop gezählt.

2.3.3. Stimulation der Monozyten

Pro Zellkulturschale wurden 1×10^7 Monozyten ausgesät. Die Zellen wurden mit S100 (10 µg/ml) entweder für 6 Stunden (für die Durchführung von Zytokin-Messungen mittels ELISA) oder für 20 Minuten (für die Durchführung von MAP-Kinasen Western blots) behandelt. Die Kontrollzellen blieben unstimuliert, um eine RAGE-Aktivierung durch andere Faktoren als den beigefügten Stimulantien auszuschließen. Als Positiv-Kontrollen dienten Lipopolysachharide (LPS) für die ELISA (100 ng/ml) und Phorbol myristate acetate (PMA) für die Western blots (100 nM/ml). Die Inkubation fand im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ statt. Die Monozytenkulturen wurden anschließend geerntet.

2.3.4. Ernten der Monozyten und Lyse der Zellen

Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die gekühlte Weiterverarbeitung der Zellkulturen auf Eis bei 4°C. Die Zellen wurden in ein 15 mL Reaktionsgefäß gegeben und auf nicht-enzymatischem Wege mittels eines Zellschabers gelöst. Nun folgte eine Zentrifugation bei 1200 RPM über 5 Minuten, anschließend wird der Überstand abgesaugt und verworfen. Das so gewonnene Zellsediment wurde nun in 1 mL PBS resuspendiert und die Zellen wurden durch eine erneute Zentrifugation bei 1200 RPM über 5 Minuten gewaschen. Hiernach wird das Zellsediment wieder in 1 mL PBS resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und fünf Minuten bei 3600 RPM und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, und das entstandene Pellet mit 200 µL Lysepuffer resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten wurden die nunmehr lysierten Zellen von Fragmenten der Membran durch eine Zentrifugation von 10 Minuten bei 14000 RPM und 4°C getrennt. Der erhaltene Überstand wurde bei -20°C asserviert.

2.3.5. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der kalorimetrischen BCA-Methode mit dem Micro BCA™ Protein Assay der Firma Pierce. Hierzu wurde die zu bestimmende Proteinlösung im Verhältnis 1:100 mit Aqua dest. verdünnt und zu jeder Probe 100 µL der BCA-Reagenz gegeben. Der Ansatz wurde dann 1 Stunde lang bei 60°C inkubiert und anschließend die Extinktion bei 492 nm photometrisch gemessen. Als Proteinstandard wurde Albumin in absteigender Konzentration von 60 µg/mL bis 0 µg/mL pipettiert.

2.3.6. Western Blot

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels eines 12%igen Trenngels (SDS-PAGE) und eines 5%igen Sammelgels. Pro Geltasche wurden 50 µg zytoplasmatisches Protein aufgetragen, welches zuvor für 5 Minuten bei 95°C

denaturiert wurde. Um die Größe der aufgetrennten Proteine bestimmen zu können wurde zudem in eine Geltasche 10 µL BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder geladen. Der Gellauf fand bei 100 Volt über 45 Minuten statt.

Für den Proteintransfer wurde die Membran für eine Minute mit Methanol benetzt und dann im Transferpuffer aquilibriert. Das Blotten fand bei 350 mA über 60 Minuten statt. Nach dem Blotten wurde die Membran in Tris-buffered saline mit 0,05% Tween20 (TBST) mit 5% Trockenmilch eine Stunde lang blockiert und über Nacht bei 4°C bei Raumtemperatur mit dem Primär-Antikörper inkubiert. Dieser Anti-p38 MAP-Kinase-Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:1000 eingesetzt. Anschließend erfolgten 5 Waschschriffe mit TBST. Der Sekundär-Antikörper Anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG wurde in einer Konzentration von 1:5000 eingesetzt, und 1 Stunde bei 20°C inkubiert. Danach erfolgte wieder ein Waschschriff mit TBST.

Die Detektion erfolgte mit einem 1:1 Einsatz von Reagenz 1 und Reagenz 2 der Chemolumineszenzlösung über 1 Minute. Hierbei wurden die Antikörper-Bindungsstellen auf der Western-Membran detektiert. Anschließend wurde die Membran gegen einen Röntgenfilm exponiert.

Mittels Strippinglösung wurde dann die Membran von den gebundenen Antikörpern befreit. Um eine gleichmäßige Proteinbeladung sicherzustellen wurde p38 mittels geeigneter Antikörper nachgewiesen. Der Primär-Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:500 in TBST mit 5%iger Trockenmilch eingesetzt. Der Sekundär-Antikörper Anti-mouse kam in einer Verdünnung von 1:5000 zum Einsatz.

Die Auswertung der Western Blots erfolgte mittels eines Densitometers. Die Filme wurden eingescannt, und die quantitative Analyse der Intensität der Banden mittels geeigneter Software (ImageJ, NIH Image) durchgeführt.

2.3.7. ELISA

Kommerziell erhältliche Quantikine Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) wurden verwendet um die Menge des von den stimulierten Monozyten freigesetzten TNF-α und IL-6 zu messen. Pro Well wurden 5×10^5 Monozyten in eine 24-well-Schale ausgesät und 6 Stunden lang mit S100 (10 µg/ml) oder LPS

(100 ng/ml) stimuliert. Als Negativ-Kontrollen dienten unstimulierte Zellen. Die zellfreien Überstände wurden nach einer Zentrifugation bei 3600 RPM über 5 Minuten abgesaugt und die Zytokinkonzentrationen mittels Standardkurven bestimmt. Wir bestimmten durchgehend Doppelwerte. Die Detektionsgrenze lag bei 2,0 ng/l für IL-6 und bei 10 ng/l für TNF- α . Die Intra-Assay Variabilität betrug 3,9 % für TNF- α und 4,3 % für IL-6.

2.4. Statistik

Die demografischen Charakteristika der Studienteilnehmer wurden mit Mittelwert und Standardabweichung (SD) beschrieben. Die Unterschiede in der Allel und Genotyp Verteilung zwischen den diversen Gruppen wurden mit den Voraussagen des Hardy-Weinberg-Equilibriums verglichen. Die Konzentrationen der diversen biochemischen Parameter wurden ebenfalls durch Mittelwert und SD angegeben, oder falls die Werte schief verteilt waren, als Median mit Interquartilen-Bereich (25.-75. Perzentile). Die Unterschiede bezüglich der Biomarker zwischen Patienten mit T2DM, IGT und gesunden Probanden wurden nach dem Student-t-Test für eine zweiseitige Fragestellung berechnet. Waren die Werte schief verteilt, so erfolgte die Berechnung der Signifikanz erst nach logarithmischer Transformation. Desweiteren berechneten wir ein Modell zur linearen Regression um die Alters- und Geschlechtskorrigierten Mittelwerte verschiedener klinischer- und Laborparameter bezogen auf die RAGE Genotypen zu bestimmen. Die logistische Regression wurde verwendet, um die unabhängige Assoziation der RAGE Genotypen mit IGT und DM zu untersuchen, während gleichzeitig für Alter, Geschlecht, BMI, Rauchen, körperliche Betätigung, Alkoholkonsum, TC/HDL-Cholesterin, Hypertonie, HbA1c, Kreatinin und antihypertensive Medikation adjustiert wurde. Die Assoziationen wurden als odds ratios (OR) mit der Angabe ihres 95% Konfidenzintervalls (CI) dargestellt. Alle p-Werte sind zweiseitig und ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen.

Für die *ex vivo* Experimente wurden die Ergebnisse als Mittelwerte \pm SD angegeben. One-way ANOVA und post-hoc Analysen wurden verwendet um die Signifikanz der Unterschiede zu den gesunden Kontrollen zu berechnen. Der Mann-Whitney U Test wurde verwendet um 2 Gruppen miteinander zu

vergleichen. Auch bei der experimentellen Studie galt ein p-Wert kleiner als 0,05 als statistisch signifikant.

Die Datenverarbeitung und die statistischen Analysen erfolgten mit dem Statistical Analysis System (SAS), in der Version 9.0.

3. Ergebnisse

3.1 Epidemiologische Studie

3.1.1 Studienpopulation

Tabelle 1 zeigt die demografischen Charakteristika der Studienpopulation. Die Studie umfasste insgesamt 1485 Teilnehmer, die mehrheitlich männlichen Geschlechts waren. Knapp die Hälfte der untersuchten Teilnehmer (40,8 %) wies einen T2DM, oder zumindest eine gestörte Glukosetoleranz auf. Diese Gruppen zeigten einen höheren BMI und höhere systolische und diastolische Blutdruckwerte. Unter den T2DM war die Erkrankung im Mittel vor 10 Jahren diagnostiziert worden, knapp die Hälfte von ihnen wurde zum Zeitpunkt der Befragung mit Antidiabetika behandelt.

Tabelle 1: Demografische Charakteristika der Studienteilnehmer (n=1485); (IGT= gestörte Glucosetoleranz, T2DM= Typ 2 Diabetes mellitus, n= Anzahl SD= Standardabweichung, m=männlich, w=weiblich, MI= Myokardinfarkt)

	Kontrollen	IGT	T2DM
n	878	353	254
Alter (SD)	63,5 (5,5)	65,0 (5,2)	65,1 (5,1)
Geschlecht m/ w [%]	47,5	58,6	57,5
Schulbildung <12 Jahren [%]	70,8	72,0	78,7
Geringe sportliche Betätigung [%]	53,0	61,9	69,2
Alkoholgenuss [%]			
Gering	26,5	26,1	36,8
Mittel	53,7	52,3	45,5
Hoch	19,8	21,6	17,8
Raucher [%]			
Aktuell	14,8	11,1	14,6
Ex-Raucher	35,6	39,7	42,9
Nichtraucher	49,6	49,3	42,5
Body mass index (kg/m²), (SD)	27,7 (4,1)	29,6 (4,1)	31,0 (4,7)
Waist-to-hip ratio	0,9 (0,1)	0,9 (0,1)	0,9 (0,1)
Diabetesdauer (in Jahren)	-	-	9,9 (7,7)
Systolischer Blutdruck (mmHg)	131,7 (19,0)	140,4 (19,1)	145,9 (21,8)
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	78,9 (10,1)	82,0 (10,4)	82,7 (11,4)
Antidiabetika [%]	0,1	0,0	42,5
Antihypertensiva [%]	28,2	47,6	55,5
Lipidsenker [%]	10,8	11,6	17,7
MI in der Anamnese [%]	3,8	4,8	7,1

3.1.2 Serumspiegel von Akute-Phase Proteinen, Zytokinen und Lipidparametern

Wie in **Tabelle 2** ersichtlich, bestanden zwischen den Probanden mit T2DM und IGT, sowie den gesunden Probanden signifikante Unterschiede bezüglich des Nüchtern-Blutzuckers, der Insulin-Resistenz und des HbA1c-Wertes. Auch zeigten sich signifikante Unterschiede bezüglich der Lipidparameter. So wiesen die von uns untersuchten Diabetiker im Schnitt einen anderthalb-fach höheren Blutzuckerwert und 60 % höhere Triglyzeride auf. Überdies hatten die Studienteilnehmer mit gestörter Glukosetoleranz oder T2DM gegenüber den Nicht-Diabetikern statistisch signifikant erhöhte CRP- und IL-6-Konzentrationen und eine höhere Leukozytenanzahl.

Tabelle 2: Serumspiegel von Akute-Phase Proteinen, Zytokinen und Lipidparametern; (IGT= gestörte Glucosetoleranz, T2DM= Typ 2 Diabetes mellitus, p= Signifikanzniveau, BZ= Blutzucker, HOMA-IR= Insulin-Resistance Score, HbA1c= Hämoglobin A1c, LDL= Low density lipoprotein, HDL= High density lipoprotein, CRP= C-reaktives Protein, SAA= Serum-Amyloid A, IL= Interleukin, sIL-6R= lösliche Interleukin-6-Rezeptor, sTNF-R= löslicher Tumornekrosefaktor-alpha-Rezeptor, MCP= Monocyte chemoattractant protein, MIP-1 α = Macrophage inflammatory protein-1-alpha, Lp-PLA₂= Lipoprotein-associated phospholipase A2)

	Kontrollen	IGT	T2DM	p
HOMA-IR	2,2 (1,8)	3,6 (2,0)	4,7 (2,2)	<0,001
Nüchtern-BZ (mg/dl)	95,4 (1,1)	107,1 (1,1)	148,1 (1,4)	<0,001
HbA1c (%)	5,5 (1,1)	5,6 (1,1)	6,6 (1,2)	<0,001
Cholesterin – ges. (mg/dl)	244,5 (41,7)	242,4 (41,0)	234,1 (45,0)	0,003
LDL-Cholesterin (mg/dl)	154,4 (39,8)	154,6 (38,3)	145,4 (40,9)	0,004
HDL-Cholesterin (mg/dl)	60,4 (16,4)	55,5 (15,3)	50,0 (14,2)	<0,001
Triglyzeride (mg/dl)	108,0 (1,6)	129,3 (1,6)	176,0 (1,8)	<0,001
Serum Albumin (g/l)	38,0 (3,9)	38,6 (3,8)	38,3 (4,2)	0,050
Leukozyten (x 10⁻³µl)	5,9 (1,4)	6,2 (1,6)	7,0 (2,0)	<0,001
CRP (mg/l)	1,5 (2,8)	2,2 (2,8)	2,6 (2,8)	<0,001
Fibrinogen (g/l)	2,8 (0,6)	2,9 (0,6)	3,1 (0,7)	<0,001
SAA (mg/dl)	3,7 (2,1)	4,4 (2,3)	5,0 (2,4)	<0,001
IL-6 (pg/ml)	1,6 (3,0)	2,0 (2,6)	2,3 (3,5)	<0,001
sIL-6R (ng/ml)	130,7 (58,2)	139,4 (60,9)	164,4 (68,5)	<0,001
IL-10 (pg/ml)	2,0 (5,8)	1,5 (5,0)	2,2 (4,6)	0,031
sTNF-R60 (ng/ml)	2,3 (1,5)	2,3 (1,5)	2,1 (1,6)	0,058
sTNF-R80 (ng/ml)	8,2 (1,7)	8,4 (1,7)	8,6 (1,7)	0,571
MCP-1 (pg/ml)	284,8 (1,8)	299,1 (1,7)	273,6 (1,8)	0,203
MIP-1α (pg/ml)	38,9 (11,8)	23,9 (16,2)	52,2 (8,0)	0,007
Lp-PLA₂ (ng/ml)	0,3 (0,1)	0,3 (0,1)	0,3 (0,1)	0,073

3.1.3 Verteilung des G(-82)→S Polymorphismus zwischen verschiedenen Studienruppen

Die Verteilung der Genotypen und die Häufigkeiten der Allele des G(-82)→S Polymorphismus im RAGE-Gen zwischen den drei Gruppen finden sich in **Tabelle 3**. Die Allel und Genotyp Verteilung zwischen den Nicht-Diabetikern, Probanden mit IGT und T2DM wich stark vom Hardy-Weinberg Equilibrium ab. Unter den Diabetikern wies kein Proband einen homozygoten AA Genotyp auf, während der GG Genotyp mit einer Häufigkeit von 95,5% vorkam. Etwa 5,5% der untersuchten T2DM wiesen einen heterozygoten Genotyp auf. Diese Verteilung zeigte in den beiden weiteren Patientengruppen keinen signifikanten Unterschied. Auffallend war, dass unter den Nicht-Diabetikern zwei Probanden einen AA Genotyp besaßen.

Ferner bestand auch in Bezug auf die Häufigkeiten der G und A Allele kein Unterschied zwischen den Diabetikern und den beiden anderen Gruppen. Die Prävalenz für das A Allel lag bei 4,5% versus 6,5% und 5,7% respektive und für das G Allel bei 100% versus 100% und 99,9%.

Tabelle 3: Genotyp und Allel Verteilung für RAGE Polymorphismen (n=1,438); (RAGE= Advanced glycation end product, AGE= Advanced glycation end product SNP= Single nucleotide polymorphism , IGT= gestörte Glucosetoleranz, T2DM= Typ 2 Diabetes mellitus)

RAGE rs2070600 SNP				
Genotypen	T2DM	IGT	Kontrollen	Gesamt
AA	0 (0 %)	0 (0 %)	2 (0,2 %)	2 (0,1 %)
GA	11 (4,5 %)	22 (6,7 %)	47 (5,5 %)	80 (5,6 %)
GG	232 (95,5 %)	318 (93,3 %)	806 (94,3)	1,356 (94,3 %)
Allele				
A	11 (2.25 %)	22 (3.35 %)	49 (2.95 %)	82 (2.9 %)
G	243 (97.75 %)	340 (96.65 %)	853 (97.05 %)	1436 (97.1 %)

3.1.4. Assoziation zwischen den Risikofaktoren für eine KHK und Inflammations-Markern sowie den RAGE Genotypen

Untersucht man den Zusammenhang zwischen Risikofaktoren für eine KHK und diversen Inflammationsmarker mit den RAGE Genotypen, so zeigen sich -wie in Tabelle 4 erkennbar- zwischen den unterschiedlichen Genotypen keinerlei signifikante Unterschiede bezüglich der diversen Parameter.

Tabelle 4: Risikofaktoren für KHK und Inflammations-Marker* nach RAGE Genotypen (KHK= Koronare Herzkrankheit, RAGE= Rezeptor für advanced glycation end product, GA= GA-Genotyp, GG= GG-Genotyp, AA= AA-Genotyp, SD= Standardabweichung ,HOMA-IR= Insulin-Resistance Score, HbA1c= Hämoglobin A1c, LDL= Low density lipoprotein, HDL= High density lipoprotein, CRP= C-reaktives Protein, SAA= Serum-Amyloid A, IL= Interleukin, sIL= lösliches Interleukin, sTNF= löslicher Tumornekrosefaktor-alpha, MCP= Monocyte chemoattractant protein, MIP-1 α = Macrophage inflammatory protein-1-alpha, Lp-PLA₂= Lipoprotein-associated phospholipase A2)

	GG	AA or GA	p
Alter	64,09	64,09	1,0
Body mass index (kg/m²), (SD)	28,66 (0,12)	28,33 (0,48)	0,484
Waist-to-hip-ratio	0,9 (0,0)	0,9 (0,01)	0,243
Systolischer Blutdruck (mmHg)	135,97 (0,53)	138,50 (2,15)	0,248
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	80,16 (0,28)	81,26 (1,14)	0,364
HOMA-IR	2,64 (1,02)	2,84 (1,08)	0,361
Nüchtern-Blutzucker (mg/dl)	105,63 (1,01)	105,50 (1,02)	0,966
HbA1c (%)	5,8 (0,02)	5,8 (0,08)	0,974
Cholesterin –ges. (mg/dl)	242,08 (1,14)	242,53 (4,65)	0,931
LDL-Cholesterin (mg/dl)	152,78 (1,08)	152,32 (4,41)	0,926
HDL-Cholesterin (mg/dl)	57,47 (0,42)	57,97 (1,7)	0,754
Triglyzeride (mg/dl)	122,36 (1,01)	121,79 (1,06)	0,94
Serum-Albumin (g/l)	38,2 (0,11)	38,72 (0,43)	0,287
Leukozyten (x10⁻³ μl)	6,19 (0,04)	6,19 (0,18)	0,965
CRP (mg/l)	1,8 (1,03)	1,65 (1,13)	0,516
Fibrinogen (g/l)	2,91 (0,02)	2,91 (0,07)	0,944
SAA (mg/dl)	4,03 (1,02)	4,62 (1,09)	0,155
IL-6 (pg/ml)	1,78 (1,03)	2,12 (1,13)	0,184
sIL-6R (ng/ml)	145,47 (2,50)	162,62 (9,66)	0,098
IL-10 (pg/ml)	1,90 (1,06)	2,10 (1,27)	0,676
sTNF-R60 (ng/ml)	2,23 (1,02)	2,25 (1,07)	0,928
sTNF-R80 (ng/ml)	8,45 (1,02)	8,35 (1,08)	0,898

MCP-1 (pg/ml)	325,52 (9,41)	379,23 (36,5)	0,323
MIP-1α (pg/ml)	101,51 (3,58)	99,71 (13,1)	0,912
Lp-PLA2 (ng/ml)	0,32 (0,00)	0,31 (0,02)	0,664

*Korrigiert für Alter und Geschlecht

3.1.5. Assoziation zwischen dem RAGE Genpolymorphismus und T2DM sowie IGT

Tabelle 5 zeigt das Ergebnis der multivariablen logistischen Regressions-Analyse in der die Assoziation zwischen dem jeweiligen RAGE Polymorphismus und dem T2DM sowie der IGT untersucht wurde. Wir fanden keine Assoziation zwischen den verschiedenen RAGE Genotypen und dem Vorhandensein einer IGT oder eines T2DM. Träger des Genotyp GA und AA hatten gegenüber den Probanden mit GG-Genotyp ein um 16% erhöhtes IGT-Risiko, welches jedoch nicht statistisch signifikant war. Die OR für T2DM bei den Personen mit GA+AA Genotyp vs Referenzgruppe (i.e. GG-Genotyp) lag nach Korrektur für Alter und Geschlecht bei 0,69 und nahm nach weiterer Korrektur auf 0,48 ($p=0,197$) ab.

Tabelle 5: Assoziation des RAGE Polymorphismus mit IGT und T2DM (n=1182)
(RAGE= Rezeptor für advanced glycation end product, GA= GA-Genotyp, GG= GG-Genotyp, AA= AA-Genotyp, IGT= gestörte Glucosetoleranz, T2DM= Typ 2 Diabetes mellitus, BMI= Body mass index, p = Signifikanzniveau, CI= Konfidenzintervalle)

	IGT vs Kontrolle	T2DM vs Kontrolle
	OR (95% CI)	OR (95% CI)
Modell 1⁺		
GG	3,2 (Referenz)	3,2 (Referenz)
GA+AA	1,13 (0,67-1,90)	0,69 (0,34-1,39)
p	0,661	0,596
Modell 2*		
GG	3,4 (Referenz)	3,4 (Referenz)
GA+AA	1,16 (0,67-2,02)	0,48 (0,16-1,46)
p	0,298	0,197

+Modell 1: korrigiert für Alter und Geschlecht

*Modell 2: zusätzlich BMI, Raucher-Status, körperliche Aktivität, Alkoholkonsum, Lipidstatus, systolischer Blutdruck, HbA1c, Serum-Kreatinin, Antihypertensiva

3.2 Experimentelle Studie

3.2.1 Assoziation zwischen dem RAGE-Genpolymorphismus und der S100-induzierten Zytokinproduktion

Abbildung 1A zeigt die unstimulierte, die S100-stimulierte und die LPS-induzierte TNF- α Sekretion in den Monozyten. Hierbei wurde die Zytokinproduktion zwischen 5 diabetischen Trägern des GA-Genotyps und 5 gesunden Trägern des GG-Genotyps verglichen. Es zeigte sich für die durch das AGE-Äquivalent S100 induzierte TNF- α Sekretion ein nicht signifikanter Trend zwischen den beiden Genotypen ($p=0,12$). LPS als Positivkontrolle induzierte eine signifikant größere inflammatorische Antwort bei Trägern des GG-Genotyps ($p=0,01$).

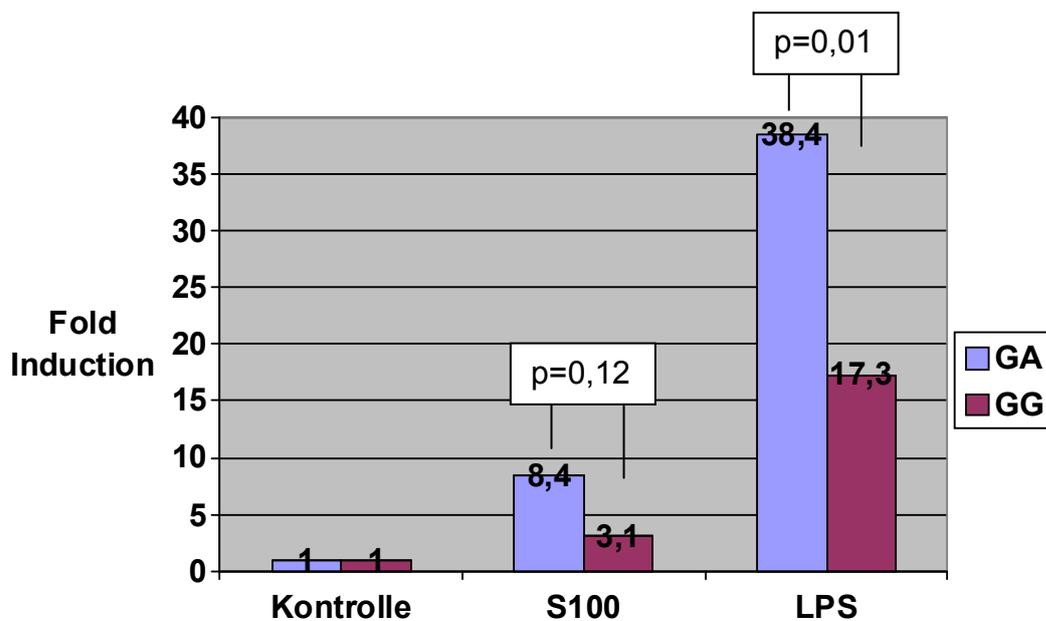


Abbildung 1A: RAGE-Genpolymorphismus und induzierte TNF- α Produktion

Die TNF- α -Sekretion ist als Vielfaches der Kontrolle dargestellt. (TNF- α = Tumornekrosefaktor-alpha, Kontrolle: unstimulierte Zellen, S100: mit S100 stimulierte Zellen, LPS (Lipopolysaccharide): mit LPS stimulierte Zellen, GA: GA-Genotyp, GG: GG-Genotyp, p = Signifikanzniveau, RAGE= Advanced glycation end product, AGE= Advanced glycation end product)

Abbildung 1B zeigt die Il-6-Produktion nach Stimulation mit S100 und LPS. Wie in Abbildung 1A wurde die Zytokinproduktion als Vielfaches der Negativkontrolle angezeigt. Wiederum lies sich hier nach der Stimulation mit S100 kein signifikanter Unterschied zwischen den Diabetikern mit GA-Genotyp und den gesunden Kontrollen mit GG-Genotyp nachweisen ($p=0,72$). Auch nach Stimulation mit der Positivkontrolle bestand zwischen beiden Genotypen kein Unterschied in der inflammatorischen Antwort ($p=0,41$).

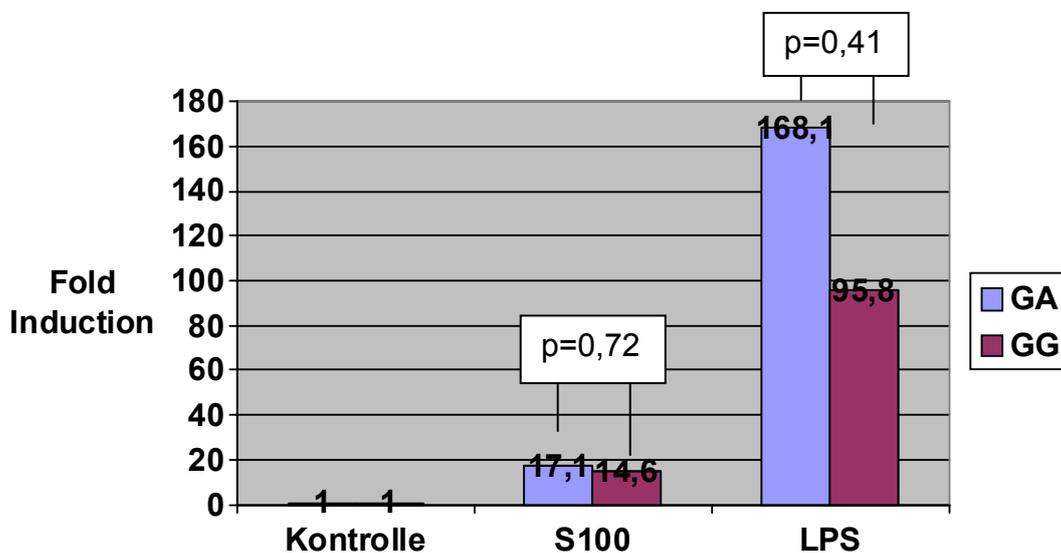


Abbildung 1B: RAGE-Genpolymorphismus und induzierte Il-6 Produktion

Die Il-6-Sekretion wurde als Vielfaches der Kontrolle dargestellt. (Interleukin= Interleukin, Kontrolle: unstimulierte Zellen, S100: mit S100 stimulierte Zellen, LPS (Lipopolysaccharide): mit LPS stimulierte Zellen, GA: GA-Genotyp, GG: GG-Genotyp, p = Signifikanzniveau, p = Signifikanzniveau, RAGE= Advanced glycation end product, AGE= Advanced glycation end product, Il= Interleukin)

3.2.2 Assoziation zwischen dem RAGE-Genpolymorphismus und der Aktivierung der p38-MAP Kinase

Abbildung 2 vergleicht den Grad der Phosphorylierung der p38-MAP Kinase in Patienten mit T2DM mit GA-Genotyp, mit dem Grad der Phosphorylierung bei gesunden Kontrollen mit GG-Genotyp. Die Phosphorylierung korreliert mit der Aktivierung der MAP Kinase. Wie unten ersichtlich, ließen sich in unserer Studie keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen feststellen.

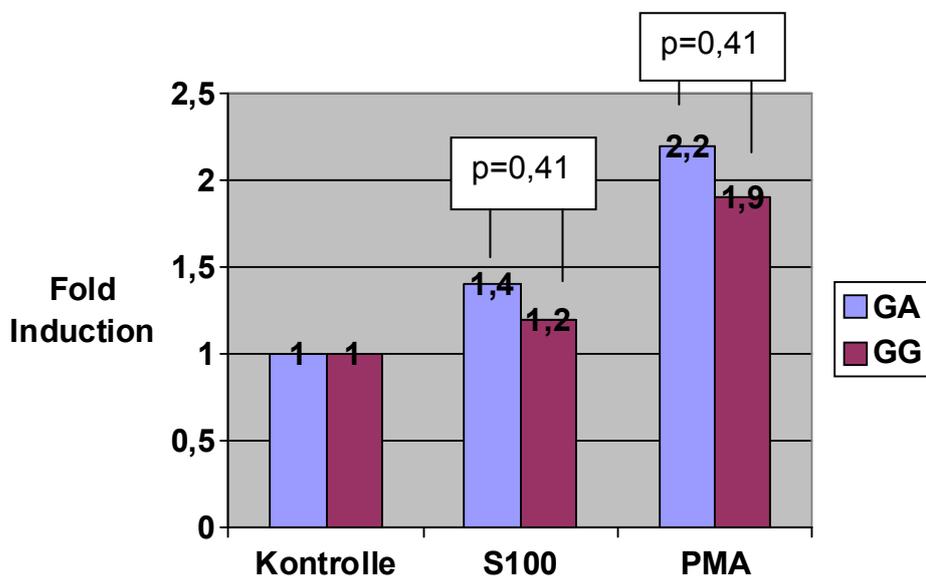


Abbildung 2: RAGE-Genpolymorphismus und Aktivierung der p38-MAP Kinase

Die p38 Phosphorylierung wurde als Vielfaches der Kontrolle dargestellt. (Kontrolle: unstimulierte Zellen, S100: mit S100 stimulierte Zellen, PMA (Phorbol myristate acetate): mit PMA stimulierte Zellen, GA: GA-Genotyp, GG: GG-Genotyp; p= Signifikanzniveau, RAGE= Advanced glycation end product, AGE= Advanced glycation end product)

Abbildung 3 zeigt eine repräsentative Western Blot Analyse zur Darstellung des Phosphorylierungsgrades der p38-MAP Kinase. Dieselbe Membran wurde mittels sog. „Strippen“ mit einem p38-MAP Kinase Antikörper inkubiert, um eine gleichmäßige Proteinbeladung nachzuweisen.

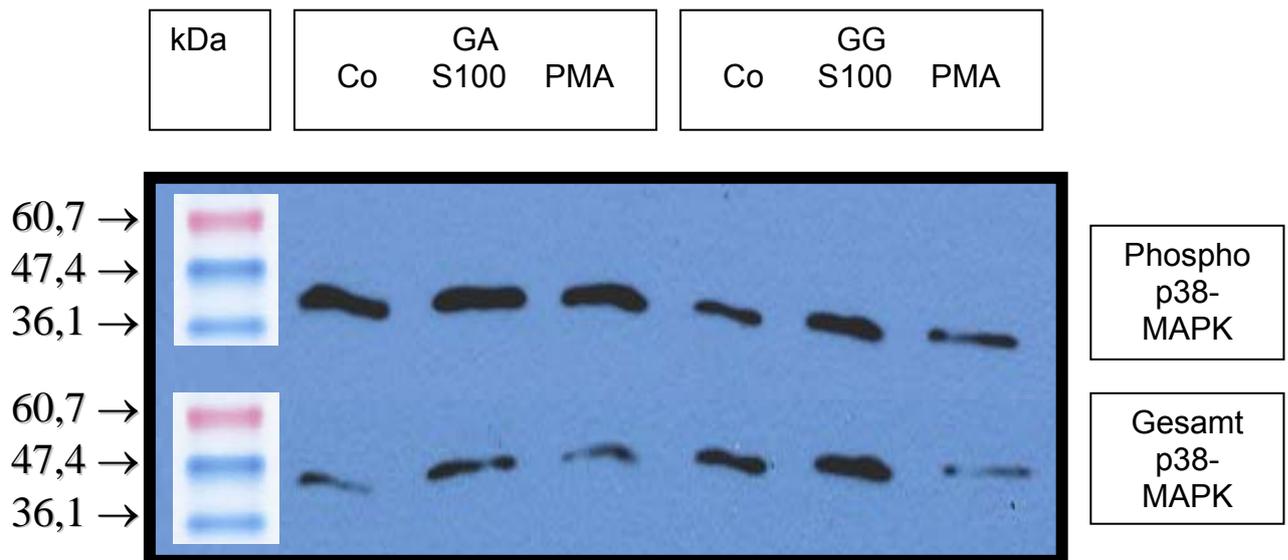


Abbildung 3: Repräsentative Western Blot Analyse zur Darstellung der Aktivierung der p38-MAP Kinase

(Kontrolle (Co): unstimulierte Zellen, S100: mit S100 stimulierte Zellen, PMA (Phorbol myristate acetate): mit PMA stimulierte Zellen, GA: GA-Genotyp, GG: GG-Genotyp)

4 Diskussion

In dieser großen Fall-Kontroll-Studie fand sich keine Assoziation des RAGE Gly82Ser Polymorphismus mit T2DM oder einer gestörten Glukosetoleranz. Ferner zeigte sich, dass der RAGE GA-Genotyp die Amplifikation einer zellulären Perturbation in einer proinflammatorischen Umgebung nicht beeinflusst. Die durch eine S100-bedingte RAGE-Aktivierung in humanen Monozyten induzierte Expression proinflammatorischer Zytokine zeigte keinen Unterschied zwischen den beiden Allelen.

4.1 Assoziation zwischen RAGE Genotyp und T2DM sowie IGT

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass der RAGE GA-Genotyp nicht mit einem häufigeren Auftreten von T2DM oder IGT assoziiert ist. Die OR für das Vorliegen eines GA+AA Genotyp bei IGT lag bei 1,13 nach Korrektur für Alter und Geschlecht und stieg auf 1,16 nach zusätzlicher Korrektur für weitere Kovariablen ($p=0,298$). Die OR für das Vorliegen eines GA+AA Genotyp bei T2DM vs dem GG-Genotyp lag nach Korrektur für Alter und Geschlecht bei 0,69 und verringerte sich nach weiterer Korrektur für BMI, Raucherstatus, körperliche Aktivität, Alkoholkonsum, Lipidstatus, systolischer Blutdruck, HbA1c, Serum-Kreatinin und Antihypertensiva auf 0,48 ($p=0,197$).

Diese Ergebnisse decken sich mit einigen bislang publizierten Arbeiten.

Hudson et al. untersuchten die Prävalenz des Gly82Ser-Polymorphismus bei 196 weißen und 156 asiatischen Probanden, ohne T2DM und 258 Patienten mit T2DM (Hudson et al. 1998). Unter den verschiedenen ethnischen Gruppen zeigte sich kein Unterschied in der Häufigkeitsverteilung der Allele. Das Glycin-Allel kam mit einer Häufigkeit von 96% und das Serin-Allel mit einer Häufigkeit von 4% vor. Dies ist mit der Häufigkeitsverteilung in unserer Studie vergleichbar. Interessant ist, dass auch in dieser Studie keine homozygoten Träger für das Serin-Allel identifiziert werden konnten. Auch dies deckt sich mit unseren Ergebnissen, da

sich auch in unserer Population unter den Diabetikern kein homozygoter Träger des Serin-Allels befand. Ferner konnte auch unter den Patienten mit T2DM kein Unterschied in der Verteilung des Polymorphismus nachgewiesen werden.

Eine weitere Studie untersuchte die Assoziation zwischen dem Gly82Ser-Polymorphismus und der KHK in einer weißen Bevölkerung. Hierfür wurden 232 Patienten, die allesamt an einer rheumatoiden Arthritis litten, genotypisiert (Carroll et al. 2007). Die Studie konnte für den RAGE G82S Polymorphismus weder eine Assoziation mit T2DM, noch eine Assoziation mit kardiovaskulären Ereignissen nachweisen.

Ein ähnliches Ergebnis zeigten die Daten der Framingham-Offspring-Studie. Hier wurde bei 1632 Probanden primär untersucht, ob eine erhöhte Prävalenz des Gly82Ser-Polymorphismus mit kardiovaskulären Ereignissen assoziiert ist (Hofmann et al. 2005). Die Autoren hatten diese Hypothese aufgestellt nachdem gezeigt worden war, dass Zellen welche die Ser82 Isform des RAGE-Gens exprimieren vermehrt inflammatorische Mediatoren ausschütteten (Hofmann et al. 2002). Es fand sich –entsprechend früheren Berichten in der Literatur, eine Häufigkeit von 93% für das Glycin-Allel und 7% für das Serin-Allel. Der Gly82Ser RAGE-Genpolymorphismus wies keine Assoziation mit einer koronaren oder kardiovaskulären Erkrankung in dieser Subpopulation aus der Framingham Studie auf.

Auch einer kürzlich veröffentlichten brasilianischen Studie gelang es nicht, eine Assoziation zwischen dem Gly82Ser Polymorphismus und einem DM vom Typ 1 und 2 nachzuweisen (Naka et al. 2006). Hier waren 105 Patienten mit DM vom Typ 1, 1147 Patienten mit T2DM und 82 gesunde Kontrollen analysiert worden. Kein Studienteilnehmer war heterozygoter Träger des Serin-Allels und es bestanden keine signifikanten Unterschiede in den Genotyp-Häufigkeiten zwischen den 3 Gruppen.

Im Gegensatz dazu fand sich in einer indischen Studie eine Assoziation des Gly82Ser –Polymorphismus mit diabetischer Retinopathie bei Patienten mit T2DM (Kumaramanickavel et al. 2002). Hierzu wurden 200 Patienten untersucht, von welchen 100 an einer diabetischen Retinopathie litten. Das Serin-Allel kam in der Patientengruppe mit diabetischer Retinopathie signifikant häufiger vor –18%, als bei Patienten ohne diabetische Komplikation –7%. In einer Kontrollgruppe die aus

50 gesunden Probanden bestand, betrug die Häufigkeit des Serin-Allels hingegen nur 2%.

Diese Studie könnte einen Hinweis dafür bieten, warum wir und auch die erwähnten anderen Gruppen keine signifikanten Assoziationen zwischen dem RAGE-Genotyp und dem Vorkommen von T2DM oder IGT nachweisen konnten. Die Autoren mutmaßen, dass der Polymorphismus in Gegenwart von diabetischen Komplikationen, also in Gegenwart von fortgeschrittenen Erkrankungen an pathophysiologischer Relevanz dazugewinnen könnte. Dies würde bedeuten, dass in unserer und den übrigen Populationen, die keine Assoziation des Serin-Polymorphismus mit IGT und DM fanden, die diabetischen Komplikationen nicht ausreichend fortgeschritten waren um signifikante Unterschiede erkennen zu lassen.

4.2 Assoziation zwischen RAGE Genotyp und kardiometabolischen Risikofaktoren sowie systemischen Markern der Inflammation

In der Annahme, dass eine genetische Variation des AGE-Rezeptors eine Rolle in der Atherogenese spielen könnte, ist ein mechanistischer Anknüpfungspunkt in der amplifizierten inflammatorischen Antwort zu finden, welche die Atherosklerose mit kennzeichnet (Ross 1999). Ein derartiger Effekt könnte zum einen in erhöhten RAGE Plasmaspiegeln resultieren, oder durch erhöhte Spiegel von systemischen Markern der Inflammation demonstriert werden, für welche eine starke und unabhängige Rolle in der Entstehung und Progression der KHK mittels großer prospektiver Studien nachgewiesen wurde. Untersucht man den Zusammenhang zwischen Risikofaktoren einer KHK sowie diversen Inflammationsmarkern mit den RAGE Genotypen, so zeigten sich in unserer Studie zwischen den unterschiedlichen Genotypen keinerlei signifikante Unterschiede.

Für die fehlende Assoziation der Inflammationssmarker TNF- α und CRP mit den verschiedenen RAGE-Genotypen liefern die Ergebnisse einer koreanischen Arbeitsgruppe eine mögliche Erklärung (Jang et al. 2007). Wie bereits erwähnt konnten wir nur wenige homozygote 82S-Allelträger identifizieren, weshalb wir für

unsere Analysen auf heterozygote Allelträger auswichen. In der erwähnten Studie ließen sich bezüglich der Inflammationsmarker keine signifikanten Unterschiede zwischen dem GG-Genotyp und dem GA-Genotyp nachweisen. Allerdings zeigte sich ein anderes Ergebnis, wenn man homozygote Träger des 82S-Allels berücksichtigte. Im Vergleich zu den Probanden mit homo- und heterozygotem G82-Allel fanden sich signifikant höhere TNF- α und IL-6-Spiegel bei den 82S-homozygoten Trägern. Somit könnte die fehlende Assoziation zwischen dem RAGE-Genotyp und den Inflammationsmarkern in unserer Studie auf den Umstand zurückgeführt werden, dass in unserer Population der Anteil der Probanden die homozygot für das 82S-Allel sind zu gering war.

4.3 RAGE GA-Genotyp und die Amplifikation der zellulären Perturbation im proinflammatorischen Umfeld

Wir haben S100 –ein Kalzium- und Zink-bindendes Protein, zur Stimulation des Rezeptors für AGE eingesetzt um ein proinflammatorisches Umfeld zu simulieren. Wir verglichen die Zytokinproduktion zwischen 2 Gruppen mit extrem unterschiedlichen Phäno- und Genotypen: 5 diabetischen Trägern des GA-Genotyps und 5 gesunden Trägern des GG-Genotyps mit der Absicht, einen möglichst großen Effekt nachzuweisen. Eine signifikant amplifizierte TNF- α und IL-6 Sekretion zwischen den untersuchten Gruppen war lediglich nach Stimulation mit der Positivkontrolle LPS nachweisbar ($p=0,01$ für beide Zytokine). Hingegen zeigte die Stimulation der Monozyten mit S100 zwar eine verstärkte TNF- α und IL-6 Sekretion in der Gruppe der T2DM mit GA-Genotyp gegenüber gesunden Kontrollen mit GG-Genotyp, allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant – $p=0,12$ für die TNF- α Sekretion und $p=0,72$ für die IL-6 Sekretion. Somit bewirkte die AGE-Stimulation mit S100 keine verstärkte Sekretion der Zytokine TNF- α und IL-6 durch Monozyten bei Patienten mit T2DM die Träger des GA-Genotyps sind. Vergleich man den Grad der Phosphorylierung der p38-MAP Kinase –welche mit der Aktivierung der MAP Kinase korreliert, bei T2DM mit GA-Genotyp, mit dem Grad der Phosphorylierung bei gesunden Kontrollen mit GG-Genotyp, so konnten

auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Der Versuch bestätigt aber, dass die durch S100 ausgelöste Sekretion proinflammatorischer Proteine von der MAP Kinase p38 abhängig ist. Die hier gezeigten Daten unterstützen somit nicht die Hypothese, dass der RAGE GA-Genotyp bei T2DM ein Risikofaktor für eine erhöhte Vulnerabilität ist.

Die Ergebnisse von Hofmann et al. zeigen, dass RAGE 82S die inflammatorische Antwort nach Stimulation mit S100 verstärkt und somit zur Amplifikation von proinflammatorischen Mechanismen bei immunologischen und inflammatorischen Krankheitsbildern beiträgt (Hofmann et al. 2002). Hierzu hatten die Autoren zunächst die Häufigkeit des GA-Genotyps bei 440 Patienten mit rheumatoider Arthritis und 440 gesunden Kontrollen bestimmt. Eine Rolle als unabhängiger Prädiktor für RA bestätigte sich hierbei für das 82S-Allel nicht.

Hiernach testeten die Autoren *ex vivo* die Monozyten von 10 gesunden Probanden, je 5 mit RAGE 82G und 5 mit 82G/82S-Allel, nach Aktivierung des AGE-Rezeptors. Es zeigte sich, dass –trotz vergleichbarer basaler TNF- α und Il-6 Sekretion beider Allel-Gruppen, die 82G/82S-Allel tragenden Monozyten nach RAGE-Stimulation signifikant mehr Zytokine sezernierten. Die 82G/82S-Allel tragenden Monozyten setzten nach der Rezeptor-Aktivierung 2,9-fach mehr Il-6 und 1,8-fach mehr TNF- α frei als die 82G-homozygoten Monozyten ($p < 0,01$). Ferner wies die Arbeitsgruppe mittels Western blot-Analysen nach, dass es nach einer RAGE-Aktivierung zu einer signifikant höheren Phosphorylierung der p44 und p42 MAP Kinasen in 82G/82S-Allel tragenden Monozyten im Vergleich zu den 82G-homozygoten Monozyten kam.

Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz zwischen unseren Ergebnissen und der Studie von Hoffmann et al. ist, dass eine RA eine weitaus stärkere, systemische Inflammation bewirkt als ein T2DM. Somit könnten die beobachteten signifikanten Unterschiede zwischen den RAGE-Genotypen in der Arbeit von Hofmann et al. auf die begleitende Erkrankung zurückzuführen sein. Die Beobachtung, dass in unserer Studie die *ex vivo* Stimulation der Monozyten mit LPS einen signifikanten Unterschied in der inflammatorischen Antwort zugunsten des GA-Genotyps zeigt, unterstützt diese These. Dies ist darauf zurückzuführen, dass LPS deutlich stärkere proinflammatorische Eigenschaften besitzt als das AGE-Äquivalent S100.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich kein Zusammenhang zwischen dem RAGE GA Genotyp und einer amplifizierten zellulären Perturbation fand. Es ist daher notwendig, größere Populationen zu untersuchen und hier insbesondere homzygote Träger beider Genotypen in der experimentellen Studie zu berücksichtigen um die Frage nach einer verstärkten Aktivierung der proinflammatorischen Signaltransduktionswege bei Trägern des 82 S Allels nach Interaktion mit AGE's abschliessend zu klären.

5. Zusammenfassung

Es ist weitgehend unklar, welche Mechanismen in der Atherosklerose des T2DM (Typ 2 Diabetes mellitus) zur Perpetuierung der Entzündungsreaktionen führen. Tierexperimentelle Daten legen nahe, dass RAGE (Receptor for advanced glycation end products)- und NFκB (Nuclear factor kappa B)-abhängige Signaltransduktionsprozesse hier eine wesentliche Rolle spielen und dass der RAGE Gly82Ser (Glycin82Serin)-Genpolymorphismus im Vergleich zum Wildtyp, nach Bindung von Liganden an den Rezeptor für RAGE eine verstärkte proinflammatorische Signalaktivität aufweist.

In einer großen süddeutschen Population wurde die Häufigkeit des G82S Polymorphismus und seine Assoziation zum T2DM bestimmt. Hier wies unter den T2DM kein Proband einen homozygoten AA Genotyp auf, während der GG Genotyp mit einer Häufigkeit von 95,5% vorkam. Etwa 5,5% der untersuchten T2DM zeigte einen heterozygoten Genotyp. Zwischen kardiometabolischen Risikofaktoren und den unterschiedlichen Genotypen zeigte sich keine Assoziation.

Im experimentellen Arm dieser Studie war eine signifikant amplifizierte TNF-α (Tumornekrosefaktor-alpha) und IL (Interleukin)-6 Sekretion zwischen den untersuchten Gruppen lediglich nach Stimulation mit der Positivkontrolle LPS (Lipopolysaccharid) nachweisbar, während die AGE (Advanced glycation end product)-Stimulation mit S100 keine verstärkte Sekretion der Zytokine TNF-α und IL-6 durch Monozyten bei Patienten mit T2DM, die Träger des GA-Genotyps sind erbrachte. Vergleich man den Grad der Phosphorylierung der p38-MAP Kinase – welche mit der Aktivierung der MAP Kinase korreliert, bei T2DM mit GA-Genotyp, mit dem Grad der Phosphorylierung bei gesunden Kontrollen mit GG-Genotyp, so liessen sich auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen feststellen. Der Versuch bestätigte aber, dass die durch S100 ausgelöste Sekretion proinflammatorischer Proteine von der MAP Kinase p38 abhängig ist.

Die Daten dieser Studie legen nahe, dass der RAGE Gly82Ser Polymorphismus weder mit einem erhöhten Risiko für eine IGT (gestörte Glukosetoleranz) noch mit einem erhöhten Risiko für T2DM einhergeht. Desweiteren zeigt die Studie, dass der RAGE GA Genotyp keinen Einfluss auf eine Amplifikation der zellulären

Perturbation in einem proinflammatorischen Umfeld –etwa unter Stimulation mit S100 besitzt.

6. Literaturverzeichnis

1. Amento E, Ehsani N, Palmer H, Lippy P. 1991. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 11:1223-1230.
2. Baeuerle P. 1991. The inducible transcription factor NF-kappa B: regulation by distinct protein subunits. *Biochim Biophys Acta* 1072:63-80.
3. Baumann M, Stehouwer C, Scheijen J, Heemann U, Struijker B, Schalkwijk C. 2008. N epsilon-(carboxymethyl)lysine during the early development of hypertension. *Ann NY Acad Sci* 1126:201-204.
4. Beckman JA, Creager MA, Libby P. 2002. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA* 287:2570-2581.
5. Bhardwaj R, Zotz C, Zwadlo-Klarwasser G, Roth J, Goebeler M, Mahnke K, Falk M, Meinardus-Hager G, 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* 22:1891-1897.
6. Bierhaus A, Chevion S, Chevion M, Hofmann M, Quehenberger P, Illmer T, Luther T, Berentshtein E, Tritschler H, Müller W and others. 1997a. Advanced glycation end product-induced activation of NF-kappaB is suppressed by alpha-lipoic acid in cultured endothelial cells. *Diabetes* 46:1481-1490.
7. Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, Nawroth PP. 1998. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovasc Res* 37:586-600.

8. Bierhaus A, Illmer T, Kasper M, Luther T, Quehenberger P, Tritschler H, Wahl P, Ziegler R, Muller M, Nawroth PP. 1997b. Advanced Glycation End Product (AGE)-mediated induction of tissue factor in cultured endothelial cells is dependent on RAGE. *Circulation* 96:2262-2271.
9. Brett J, Schmidt AM, Yan SD, Zou YS, Weidman E, Pinsky D, Nowygrod R, Nepper M, Przysiecki C, Shaw A and others. 1993. Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *Am J Pathol* 143:1699-1712.
10. Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. 1988. Advanced glycation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med* 318:1315-1321.
11. Bucala R, Makita Z, Koschinsky T, Cerami A, Vlassara H. 1993. Lipid advanced glycosylation: pathway for lipid oxidation in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 90:6434-6438.
12. Bucala R, Model P, Cerami A. 1984. Modification of DNA by reducing sugars: a possible mechanism for nucleic acid aging and age-related dysfunction in gene expression. *Proc Natl Acad Sci* 81:105-109.
13. Bucala R, Tracey K, Cerami A. 1991. Advanced glycosylation end products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. *J Clin Invest* 87:432-438.
14. Bucciarelli LG, Wendt T, Qu W, Lu Y, Lalla E, Rong LL, Goova MT, Moser B, Kislinger T, Lee DC and others. 2002. RAGE blockade stabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-Null mice. *Circulation* 106:2827-2835.
15. Cai W, Zhu L, Chen X, Uribarri J, Peppas M. 2006. Association of advanced glycation end products and inflammation markers with thrombosis of arteriovenous grafts in hemodialysis patients. *Am J Nephrol* 26:181-185.

16. Carroll L, Frazer IH, Turner M, Marwick TH, Thomas R. 2007. Receptor for advanced glycation end products Glycine 82 Serine polymorphism and risk of cardiovascular events in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 9:R39.
17. Cavallo M, Pozzilli P, Bird C, Wadhwa M, Meager A, Visalli N, Gearing A, Andreani D, Thorpe R. 1991. Cytokines in sera from insulin-dependent diabetic patients at diagnosis. *Clin Exp Immunol* 86:256-259.
18. Chavakis E, Hain A, Vinci M, Carmona G, Bianchi ME, Vajkoczy P, Zeiher AM, Chavakis T, Dimmeler S. 2007. High-Mobility Group Box 1 activates integrin-dependent homing of endothelial progenitor cells. *Circ Res* 100:204-212.
19. Cheng C, Tempel D, van Haperen R, van Damme L, Algür M, Krams R, de Crom R. 2009. *Atherosclerosis* 204:26-33.
20. Choudhury RP, Lee JM, Greaves DR. 2005. Mechanisms of disease: macrophage-derived foam cells emerging as therapeutic targets in atherosclerosis. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2:309-315.
21. Duraisamy Y, Slevin M, Smith N, Bailey J, Zweit J, Smith C, Ahmed N, Gaffney J. 2001. Effect of glycation on basic fibroblast growth factor induced angiogenesis and activation of associated signal transduction pathways in vascular endothelial cells: possible relevance to wound healing in diabetes. *Angiogenesis* 4:277-288.
22. Esposito C, Gerlach H, Brett J, Stern D, Vlassara H. 1989. Endothelial receptor-mediated binding of glucose-modified albumin is associated with increased monolayer permeability and modulation of cell surface coagulant properties. *J Exp Med* 170:1387-1407.
23. Friedman E. 1999. Advanced glycosylated end products and hyperglycemia in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care* 22 Suppl:B65-71.

24. Fu M, Wells-Knecht K, Blackledge J, Lyons T, Thorpe S, Baynes J. 1994. Glycation, glycoxidation, and cross-linking of collagen by glucose. Kinetics, mechanisms, and inhibition of late stages of Maillard reaction. *Diabetes* 43:676-683.
25. Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim Y-C, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA, Luster AD, Luscinskas FW, Rosenzweig A. 1999. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* 398:718-723.
26. Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ. 1998. Absence of Monocyte Chemoattractant Protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell* 2:275-281.
27. Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M. 1998. Mortality from coronary heart disease in subjects with Type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med* 339:229-234.
28. Hansson GK. 2005. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 352:1685-1695.
29. Herder C, Baumert J, Thorand B, Martin S, Lowel H, Kolb H, Koenig W. 2006. Chemokines and Incident Coronary Heart Disease: Results from the MONICA/KORA Augsburg case-cohort study, 1984-2002. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:2147-2152.
30. Hofmann M, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi Y, Lu Y, Avilla C, Kambham N, Bierhaus A, Nawroth P. 1999. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/Calgranulin polypeptides. *Cell* 97:889-901.

31. Hofmann M, Drury S, Hudson BI, Gleason M, Qu W, Lu Y, Lalla E, Chitnis S, Monteiro J, Stickland MH and others. 2002. RAGE and arthritis: the G82S polymorphism amplifies the inflammatory response. *Genes Immun* 3:123-135.
32. Hofmann M, Yang Q, Harja E, Kedia P, Gregersen P, Cupples L, Schmidt A, Hudson BI. 2005. The RAGE Gly82Ser polymorphism is not associated with cardiovascular disease in the Framingham offspring study. *Atherosclerosis* 182:301-305.
33. Hudson B, Stickland M, Grant P. 1998. Identification of polymorphisms in the receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene: prevalence in type 2 diabetes and ethnic groups. *Diabetes* 47:1155-1157.
34. Hudson BI, Stickland MH, Futers TS, Grant PJ. 2001. Effects of novel polymorphisms in the RAGE gene on transcriptional regulation and their association with diabetic retinopathy. *Diabetes* 50:1505-1511.
35. Ichikawa K, Nakagawa K, Hirano K, Sueishi K. 1996. The localization of tissue factor and apolipoprotein(a) in atherosclerotic lesions of the human aorta and their relation to fibrinogen-fibrin transition. *Pathol Res Pract* 192:224-232.
36. Ichikawa K, Yoshinari M, Iwase M, Wakisaka M, Doi Y, Lino K, Yamamoto M, Fujishima M. 1998. Advanced glycation end products induced tissue factor expression in human monocyte-like U937 cells and increased tissue factor expression in monocytes from diabetic patients. *Atherosclerosis* 136:281-287.
37. Ishida T, Tanaka K. 1982. Effects of fibrin and fibrinogen-degradation products on the growth of rabbit aortic smooth muscle cells in culture. *Atherosclerosis* 44:161-171.

38. Jang Y, Kim J, Kang S, Kim J, Chae J, Kim O, Koh S, Lee H, Ahn C, Song Y and others. 2007. Association of the Gly82Ser polymorphism in the receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene with circulating levels of soluble RAGE and inflammatory markers in nondiabetic and nonobese Koreans. *Metabol* 56:199-205.
39. Johnson JL, Sala-Newby GB, Ismail Y, Aguilera CM, Newby AC. 2008. Low tissue inhibitor of metalloproteinases 3 and high matrix metalloproteinase 14 levels defines a subpopulation of highly invasive foam-cell macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:1647-1653.
40. Juhan-Vague I, Alessi M. 1997. PAI-1, obesity, insulin resistance and risk of cardiovascular events. *Thromb Haemost* 78:656-660.
41. Khechai F, Ollivier V, Bridey F, Amar M, Hakim J, de Prost D. 1997. Effect of advanced glycation end product–modified albumin on tissue factor expression by monocytes: role of oxidant stress and protein tyrosine kinase activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:2885-2890.
42. Kumaramanickavel G, Ramprasad V, Sripriva S, Upadyay N, Paul P, Sharma T. 2002. Association of Gly82Ser polymorphism in the RAGE gene with diabetic retinopathy in type II diabetic asian indian patients. *J Diabetes Complications* 16:391-394.
43. Lagasse E, Clerc R. 1988. Cloning and expression of two human genes encoding calcium-binding proteins that are regulated during myeloid differentiation. *Mol Cell Biol* 8:2402-2410.
44. Libby P. 2001. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 104:365-372.
45. Libby P, Ridker PM, Maseri A. 2002. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105:1135-1143.

46. Libby P, Schoenbeck U, Mach F, Selwyn AP, Ganz P. 1998. Current Concepts in Cardiovascular Pathology: The role of LDL cholesterol in plaque rupture and stabilization. *Am J Med* 104:14S-18S.
47. Liew-A-Fa MLM, van Hinsbergh VWM, Teerlink T, Barto R, Twisk J, Stehouwer CDA, Schalkwijk CG. 2004. Increased levels of N{epsilon}-(carboxymethyl)lysine and N{epsilon}-(carboxyethyl)lysine in type 1 diabetic patients with impaired renal function: correlation with markers of endothelial dysfunction. *Nephrol Dial Transplant* 19:631-636.
48. Liu L, Xiang K. 1999. RAGE Gly82Ser polymorphism in diabetic microangiopathy. *Diabetes Care* 22:646.
49. Löwel H, Koenig W, Engel S, Hörmann A, Keil U. 2000. The impact of diabetes mellitus on survival after myocardial infarction: can it be modified by drug treatment? Results of a population-based myocardial infarction register follow-up study. *Diabetologia* 43:218-226.
50. Marx N, Blessing E. Diabetes mellitus and coronary artery disease. Update on diagnosis and drug therapy. *Dtsch Med Wochenschr.* 132:1034-1038.
51. Marx N, Froehlich J, Siam L, Ittner J, Wierse G, Schmidt A, Scharnagl H, Hombach V, Koenig W. 2003a. Antidiabetic PPAR{gamma}-activator rosiglitazone reduces MMP-9 serum levels in Type 2 diabetic patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:283-288.
52. Marx N, Imhof A, Froehlich J, Siam L, Ittner J, Wierse G, Schmidt A, Maerz W, Hombach V, Koenig W. 2003b. Effect of Rosiglitazone treatment on soluble CD40L in patients with Type 2 diabetes and coronary artery disease. *Circulation* 107:1954-1957.
53. Meisinger C, Loewel H, Mraz W, Koenig W. 2005. Prognostic value of apolipoprotein B and A-I in the prediction of myocardial infarction in middle-aged men and women: results from the MONICA/KORA Augsburg cohort study. *Eur Heart J* 26:271-278.

54. Naka CL, Picheth G, Alcantera VM, Rea RR, Chautard-Freire-Maia EA, Pedrosa FdO, Martinez TLdR, Souza EM. 2006. The Gly82Ser polymorphism of the receptor of advanced glycation end product (RAGE) gene is not associated with type 1 or Type 2 diabetes in a Brazilian population. *Diabetes Care* 29:712-713.
55. Napoli C, D'Armiento F, Mancini F, Postiglione A, Witztum J, Palumbo G, Palinski W. 1997. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 100:2680-2690.
56. Nawroth P, Bierhaus A, Vogel G, Hofmann M, Zumbach M, Wahl P, Ziegler R. 1999. Non-enzymatic glycation and oxidative stress in chronic illnesses and diabetes mellitus. *Med Klin (Munich)* 94:29-38.
57. Neeper M, Schmidt A, Brett J, Yan S, Wang F, Pan Y, Elliston K, Stern D, Shaw A. 1992. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem* 267:14998-15004.
58. Newby AC. 2008. Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:2108-2114.
59. Njoroge F, Monnier V. 1989. The chemistry of the Maillard reaction under physiological conditions: a review. *Prog Clin Biol Res* 304:85-107.
60. Odink K, Cerletti N, Bruggen J, Clerc R, Tarcsay L, Zwadlo G, Gerhards G, Schlegel R, Sorg C. 1987. Two calcium-binding proteins infiltrate macrophages in rheumatoid arthritis. *Nat Med* 330:80-82.

61. Ohgami N, Nagai R, Ikemoto M, Arai H, Kuniyasu A, Horiuchi S, Nakayama H. 2001. CD36, a member of the class B scavenger receptor family, as a receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem* 276:3195-3202.
62. Park L, Raman KG, Lee KJ, Lu Y, Ferran LJ, Chow W, Stern D, Schmidt A. 1998. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nat Med* 4:1025-1031.
63. Poirier O, Nicaud V, Vionnet N, Raoux S, Tarnow L, Vlassara H, Parving H-H, Cambien F. 2001. Polymorphism screening of four genes encoding advanced glycation end product putative receptors: association study with nephropathy in type 1 diabetic patients. *Diabetes* 50:1214-1218.
64. Prevost G, Fajardy I, Fontaine P, Danze P, Besmond C. 1999. Human RAGE GLY82SER dimorphism and HLA class II DRB1-DQA1-DQB1 haplotypes in type 1 diabetes. *Eur J Immunogenet* 26:343-348.
65. Pulkkinen A, Viitanen L, Kareinen A, Lehto S, Laakso M. 2000. Gly82Ser polymorphism of the receptor of advanced glycation end product gene is not associated with coronary heart disease in Finnish nondiabetic subjects or in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 23:864.
66. Quehenberger P, Bierhaus A, Fasching P, Muellner C, Klevesath M, Hong M, Stier G, Sattler M, Schleicher E, Speiser W and others. 2000. Endothelin 1 transcription is controlled by nuclear factor-kappaB in AGE-stimulated cultured endothelial cells. *Diabetes* 49:1561-1570.
67. Raines EW, Ross R. 1993. Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *Br Heart J* 69:S30-37.
68. Rammes A, Roth J, Goebeler M, Klempt M, Hartmann M, 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* 272:9496-9502.

69. Ray A, Huisman MV, Tamsma JT, van Asten J, Bingen BO, Broeders EA, Hoogeveen ES, van Hout F, Kwee VA, Laman B and others. 2009. The role of inflammation on atherosclerosis, intermediate and clinical cardiovascular endpoints in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Intern Med* 20:253-260.
70. Reddy S, Bichler J, Wells-Knecht K, Thorpe S, Baynes J. 1995. N epsilon-(carboxymethyl)lysine is a dominant advanced glycation end product (AGE) antigen in tissue proteins. *Biochemistry* 34:10872-10878.
71. Rose G, McCartney P, Reid D. 1977. Self-administration of a questionnaire on chest pain and intermittent claudication. *Br J Prev Soc Med* 31(1):42-48.
72. Ross R. 1999. Atherosclerosis -- An Inflammatory Disease. *N Engl J Med* 340:115-126.
73. Rumble J, Cooper M, Soulis T, Cox A, Wu L, Youssef S, Jasik M, Jerums G, Gilbert R. 1997. Vascular hypertrophy in experimental diabetes. Role of advanced glycation end products. *J Clin Invest* 99:1016-1027.
74. Schleicher E, Wagner E, Nerlich A. 1997. Increased accumulation of glycoxidation product carboxymethyllysine in human tissues in diabetes and ageing. *J Clin Invest* 99:457-468.
75. Schmidt A, Hasu M, Popov D, Zhang J, Chen J, Yan S, Brett J, Cao R, Kuwabara K, Costache G and others. 1994a. Receptor for advanced glycation end products (AGEs) has a central role in vessel wall interactions and gene activation in response to circulating AGE proteins. *Proc Natl Acad Sci* 91:8807-8811.
76. Schmidt A, Hori O, Brett J, Yan S, Wautier J, Stern D. 1994b. Cellular receptors for advanced glycation end products. Implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. *Arterioscler Thromb* 14:1521-1528.

77. Schmidt A, Stern D. 2000. Atherosclerosis and diabetes: the RAGE connection. *Curr Atheroscler Rep* 2:430-436.
78. Schmidt A, Yan S, Wautier J, Stern D. 1999. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res* 84:489-497.
79. Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. 2001. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest* 108:949-955.
80. Sebekova K, Somoza V, Jarcuskova M, Heidland A, Podracka L. 2008. Plasma advanced glycation end products are decreased in obese children compared with lean controls. *Int J Pediatr Obes* 21:1-7.
81. Shih PT, Brennan M-L, Vora DK, Territo MC, Strahl D, Elices MJ, Lusis AJ, Berliner JA. 1999. Blocking very late antigen-4 integrin decreases leukocyte entry and fatty streak formation in mice fed an atherogenic diet. *Circ Res* 84:345-351.
82. Smith E. 1986. Fibrinogen, Fibrin and fibrin degradation products in relation to atherosclerosis. *Clin Haematol* 15:355-70.
83. Vlassara H, Bucala R, Striker L. 1994. Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. *Lab Invest* 70:138-151.
84. Wang X, Desai K, Chang T, Wu L. 2005. Vascular methylglyoxal metabolism and the development of hypertension. *J Hypertens* 23:1565-1573.

85. WHO. 1999. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of a WHO consultation. WHO, Geneva.
86. Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM, Gordon D. 1989. Localization of tissue Factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci* 86:2839-2843.
87. Wilson HM, Barker RN, Erwig LP. 2009. Macrophages: promising targets for the treatment of atherosclerosis. *Curr Vasc Pharmacol* 7:234-243.
88. Witztum J, Steinberg D. 2001. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? *Trends Cardiovasc Med* 11:93-102.
89. Wu J. 1993. Advanced glycation end products: a new disease marker for diabetes and aging. *J Clin Lab Anal* 7:252-255.
90. Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A, Slattery T, Zhao L, Nagashima M, Morser J and others. 1996. RAGE and amyloid-[beta] peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 382:685-691.

7. Appendix

7.1. Blutabnahme-Protokoll

Erhebungsnummer	_____
Untersuchernummer (Fall/Kontroll Status)	_____ (_____)
Datum, Uhrzeit Beginn Blutabnahme	Datum: ___/___/___ Uhrzeit: __. __
Geschlecht des Probanden	männlich (=1); weiblich (=2) _____
Hatten Sie innerhalb der letzten vier Wochen eine Erkältung oder eine andere akute Erkrankung?	Ja (=1); nein (=2) _____ wenn ja, welche _____
Leiden Sie an einer Bluterkrankheit (Hämophilie)?	ja (=1); nein (=2) _____
Welche Medikamente nehmen Sie derzeit regelmäßig ein? Bitte geben Sie den exakten Handelsnamen und die Dosierung an.	Name (exakter Handelsname) 1..... Dosierung:..... 2..... Dosierung:..... 3..... Dosierung:..... 4..... Dosierung:.....
Besondere Vorkommnisse bei der Blutabnahme	_____

7.2. Übereignungsvertrag



Universitätsklinikum Ulm, D-89070 Ulm
Medizinische Klinik und Poliklinik

Abteilung Innere Medizin II
Kardiologie, Angiologie,
Nephrologie, Pneumologie

Ärztlicher Direktor
Prof. Dr. med. V. Hombach
Robert-Koch-Straße 8

Universitätsklinikum Ulm, D-89070 Ulm
Medizinische Klinik und Poliklinik

Abteilung Innere Medizin II
Kardiologie, Angiologie,
Nephrologie, Pneumologie

Ärztlicher Direktor
Prof. Dr. med. V. Hombach
Robert-Koch-Straße 8
89081 Ulm, den
Tel (0731) 500-24441
Fax (0731) 500-24442

ÜBEREIGNUNGSVERTRAG

Zwischen der Universität Ulm, handelnd für die Abteilung Innere Medizin II vertreten durch Frau/Herrn Dr. _____ und Frau/Herrn _____ wird folgendes vereinbart:

1. Frau/Herr _____ wird der Universität Ulm das Eigentum an folgendem Körpermaterial unentgeltlich übertragen: *80 ml Blut*
2. Die Universität wird das Körpermaterial zu wissenschaftlichen Zwecken, insbesondere zur *Isolierung von Monozyten zur Weiterverwendung für experimentelle Untersuchungen* verwenden.

Eine kommerzielle Verwendung ist ausgeschlossen. Die Anonymität des Spenders bleibt gewahrt. Die Proben werden nach Abschluss der Analysen sofort vernichtet.

(Name der Teilnehmerin/des Teilnehmers)

Ort, Datum
Teilnehmers)

(Unterschrift der Teilnehmerin/des

Mit der edv-mäßigen Verarbeitung der bei mir im Rahmen des obengenannten Forschungsprojektes erhobenen Daten bin ich einverstanden.

(Name der Teilnehmerin/des Teilnehmers)

Ort, Datum
Teilnehmers)

(Unterschrift der Teilnehmerin/des

8. Danksagung

Ich möchte mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer und größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang Koenig für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Seine stete Unterstützung und Motivation bedeuten mir sehr viel.

Frau Dr. med. Natalie Khuseyinova danke ich ganz herzlich für die gute Betreuung und die produktive Zusammenarbeit.

Ein besonderer Dank gilt auch allen technischen Assistentinnen der Abteilungslabore, insbesondere Gerlinde, Helga und Miriam, sowohl für die zwischenmenschliche, als auch für die hervorragende arbeitstechnische Unterstützung.

Außerdem danke ich Frau PD Dr. Christa Meisinger für die gute Zusammenarbeit und die Übernahme des Zweitgutachtens und Herrn Prof. Dr. Jochen Wöhrle und Frau Prof. Dr. Marion Schneider für die Übernahme des Wahlprüferamtes.

Meinen Eltern und Geschwistern danke ich von Herzen, dass sie mich durch das Studium hindurch immer bedingungslos unterstützt und motiviert haben und mir auch heute noch stets zur Seite stehen.

Schließlich danke ich meiner Ehefrau für ihre Liebe, ihre verständnisvolle Geduld sowie ihre permanente Unterstützung und Motivation!

9. Lebenslauf

Name: Mahir Karakas

Geburtsdatum: 18.04.1981

Geburtsort: Blaubeuren

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Familienstand: verheiratet

Hochschulbildung:
10/2000 – 05/2007 Studium der Humanmedizin, Universität Ulm

Schulbildung:
1991 - 2000 Kepler-Gymnasium, Ulm

Promotion:
laufend „RAGE-Genpolymorphismus bei Diabetikern und Prädiabetikern: Von einer bevölkerungsbasierten Studie zur möglichen funktionellen Relevanz. Ergebnisse der KORA S2000 Studie.“

Berufsausbildung:
06/2007-06/2008: Assistenzarzt in der Inneren Medizin III, Kardiologie, Universitätsklinik Frankfurt
07/2008-12/2008: Assistenzarzt in der Inneren Medizin I, Kardiologie, LMU-Universitätsklinik München
Seit 01/2009: Assistenzarzt in der Inneren Medizin II, Kardiologie, Universitätsklinik Ulm