

„Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“

gez: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab

Dekan

Referent: Prof. Dr. Plum

Korreferent: Prof. Dr. Schwartzkopff

Aus der Klinik für Nephrologie und Rheumatologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. B. Grabensee

Effekte der Angiotensin II-Inhibition auf Proliferationsverhalten und Wachstum von
Mesangiumzellen einer Rattenzellkultur

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Natalia Gogolok

2003

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis	II
1 Einleitung	1
2 Hypothese und Fragestellung	10
3 Material und Methoden	12
3.1 Material und Geräte	12
3.2 Zellkultur und Zellzahlbestimmung.....	14
3.3 Aussaat, Synchronisation und Stimulation der Mesangiumzellen.....	15
3.4 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Test.....	17
3.5 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)-Test.....	18
3.6 Proteingehaltbestimmung	19
3.7 Laktatdehydrogenase (LDH)-Toxizitätstest	22
3.8 RT-PCR	23
3.9 Lichtmikroskopische Begutachtung der Zellen, Fotodokumentation.....	27
3.10 Statistik	28
4 Ergebnisse.....	29
4.1 Testung einer optimalen Mediumzusammensetzung:.....	29
4.2 Toxizität der verwendeten Substanzen	30
4.3 Zellproliferation (MTT- und BrdU-Test)	31
4.4 Wirkung eines AT1-Rezeptorantagonisten und eines ACE-Hemmers auf die Zellproliferation	33
4.5 Zellhypertrophie (Proteingehaltbestimmung).....	34
4.6 Wirkung eines AT1-Rezeptorantagonisten und eines ACE-Hemmers auf die Zellhypertrophie.....	37
4.7 Expression des „early growth response (Egr-1)-gene“ auf mRNA-Ebene.....	39
4.8 Färbung der Zellen mit Hämatoxylin und lichtmikroskopische Begutachtung...	41
5 Diskussion	44
5.1 Methodische Diskussion	44
5.2 Hypertrophie, Hyperplasie und Endoreduplikation	46
5.3 Einfluss des AT1-Antagonisten Valsartan auf die durch Ang II ausgelöste Endoreduplikation.....	48
5.4 Bedeutung des AT2-Rezeptors	49
5.5 Bedeutung des „early growth response genes-1“ (Egr-1) als Wachstumsfaktor auf intrazelluläre Vorgänge.....	50
5.6 Lokales RAAS an Mesangiumzellen.....	52
6 Kritische Wertung und Ausblicke	54
7 Zusammenfassung	56
8 Literaturverzeichnis	58
9 Danksagung	65
10 Lebenslauf	66

Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
ACE	A ngiotensin C onverting E nzyme
ACTH	Adrenokortikotropes Hormon (a drenocorticoid h ormon)
<i>A. dest</i>	destilliertes Wasser (<i>Aqua destillata</i>)
Ang II	A ngiotensin I I
AT1-Rezeptor	A ngiotensin I I- R ezeptor T yp 1
bp	B asenpaare
BrdU-Test	5- B romo-2'- d eoxyuridine
BSA	Rinderserumalbumin (b ovine serum a lbumin)
Ca ²⁺	C alcium
CDK	Cyclin abhängige Kinase (C ycline d ependent K inase)
DAG	D iacylglycerin
DEPC	D iethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonucleinsäure (d esoxyribonucleic a cid)
cAMP	zyklisches A denosin m onophosphat
cDNA	komplementäre DNA (c omplement D NNA)
dNTP	d esoxy N ukleosid-5'- t riphosphat
DTT	D ithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin Tetraessigsäure (e thylen d iamin t etra a cetic a cid)
Egr-1	E arly g rowth r esponse-gene- 1
EGTA	E thylen g lycol-bis (aminoethylether)- t etraacetic a cid
<i>et al.</i>	<i>et alius</i> : "und Andere"
ET-1	E ndothelin-1
FCS	Fätales Kälber Serum (f etal c alf s erum)
FGF	f ibroblast g rowth f actor
G-Protein	guanylnukleotidbindendes P rotein
h	Stunde (lateinisch: h ora)
HBEGF	h eparin b inding e ndothelin g rowth f actor
HEPES	N-2- h ydroxyethyl- p iperazine-2-ethanesulfonic acid
IL-1	I nterleukin- 1
IP3	I nositol t riphosphat
kDa	K ilo D alton
LDH	L aktat- D ehydrogenase-Toxizitäts
min	M inuten
MTP	M ulti T iter P latte; 96-well-Platte
MTT	(3-(4,5- D imethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NA	N oradrenalin
NAD ⁺	N icotinamid- a denin- d inukleotid (oxidiert)
NADP ⁺	N icotinamid- a denin- d inukleotid- p hosphat (oxidiert)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (p hosphat- b uffered s aline)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (p olymerase c hain r eaction)
PDGF	p lateled d erived g rowth f actor
PG	P rostadglandine

PI2	Phosphatidylinositolbiphosphat
PLA2	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PK	Proteinkinase
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
ROS	reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur
RT-Reaktion	Reverse Transkriptase Reaktion
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
STH	Somatotropes Hormon
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA
TGF- β	transforming growth factor-β
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
<i>in vivo</i>	lateinisch: Untersuchung am lebenden Organismus
<i>in vitro</i>	lateinisch: Untersuchung außerhalb des lebenden Organismus
well	Bezeichnung für Vertiefung, Reaktionsgefäß

1 Einleitung

Viele Glomerulonephritiden (GN) weisen als charakteristisches Merkmal die Proliferation von sogenannten Mesangiumzellen auf, wie beispielsweise die IgA-Nephritis (Morbus Berger), die Membranproliferative GN, die Lupusnephritis oder die diabetische Nephropathie [33]. Pathogenetische Vorgänge bei diesen Formen von Glomerulonephritiden stellen die zelluläre Proliferation von Mesangiumzellen sowie die Vermehrung der extrazellulären Matrix, d.h. die Fähigkeit der Zellen biologisch aktive Substanzen zu sezernieren und die Fähigkeit auf spezifische inflammatorische Mediatoren zu reagieren, dar. Letztendlich führen diese Vorgänge zur Glomerulosklerose und Fibrose des Nierengewebes im Endstadium [52].

Es gibt viele Faktoren, die die Pathogenese einer Glomerulonephritis vorantreiben und begünstigen. Dazu gehören hoher Blutdruck sowie toxische, metabolische oder immunologische Einflüsse. Für den Bluthochdruck spielt im Rahmen von Nierenerkrankungen die Stimulierung des sogenannten Renin-Angiotensin II-Aldosteron-Systems (RAAS) eine entscheidende Rolle (Abbildung 1). Angiotensin II (Ang II) entsteht als Folge der Freisetzung von Renin in der Niere. Renin ist ein Glykoprotein und wird im Bereich des juxtaglomerulären Apparates eines Nephrons von spezialisierten Zellen der zuführenden Arteriole in die Blutbahn bei Abfall des Natriumionen-Bestandes des Organismus oder infolge sympathischer Innervation über β_1 -Rezeptoren abgegeben. Das Renin hat im Blut die Funktion einer Protease und spaltet vom Angiotensinogen, das aus der Leber stammt, das Dekapeptid Angiotensin I ab. Unter der Einwirkung des Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) entsteht das Angiotensin II. Angiotensin II bindet an eigene Rezeptoren, die als AT1- und als AT2-Rezeptoren bezeichnet werden. Angiotensin II (Ang II) ist ein Oktapeptid mit vielen Funktionen zur Beeinflussung des Gefäßtonus (stärkster Vasokonstriktor), der glomerulären Hämodynamik, des tubulären Transports und fungiert als Modulator von chemischen Signalen an verschiedenen Zellen wie Mesangium- und tubulointestinalen Zellen. Es gehört sowohl zu dem autokrinen System (Zellen, die Substanzen oder Wachstumsfaktoren synthetisieren bzw. abgeben, mit denen wiederum auf Zellen vom gleichen Typ Einfluss genommen wird) wie zu dem parakrinen System (Zellen, die Substanzen, Wachstumsfaktoren synthetisieren mit denen Einfluss auf Nachbarzellen oder Zellen vom anderem Typ genommen wird), das das Wachstum von beispielsweise Mesangiumzellen beeinflusst [5]. Untersuchungen zufolge gibt es immer mehr Hinweise auf ein Wirken des RAAS nicht nur im systemischen,

sondern auch im lokalen, gewebs-gebundenen Bereich. Dieser Theorie nach sollen beispielsweise Endothelzellen, Gefäßmuskelzellen und eventuell Mesangiumzellen in der Lage sein, durch eine Eigenproduktion an Renin und Angiotensin II eine Selbststeuerung des lokalen Gewebs- oder Zellwachstums vorzunehmen. Hierbei kann auch eine Verstärkung des systemischen RAAS erfolgen.

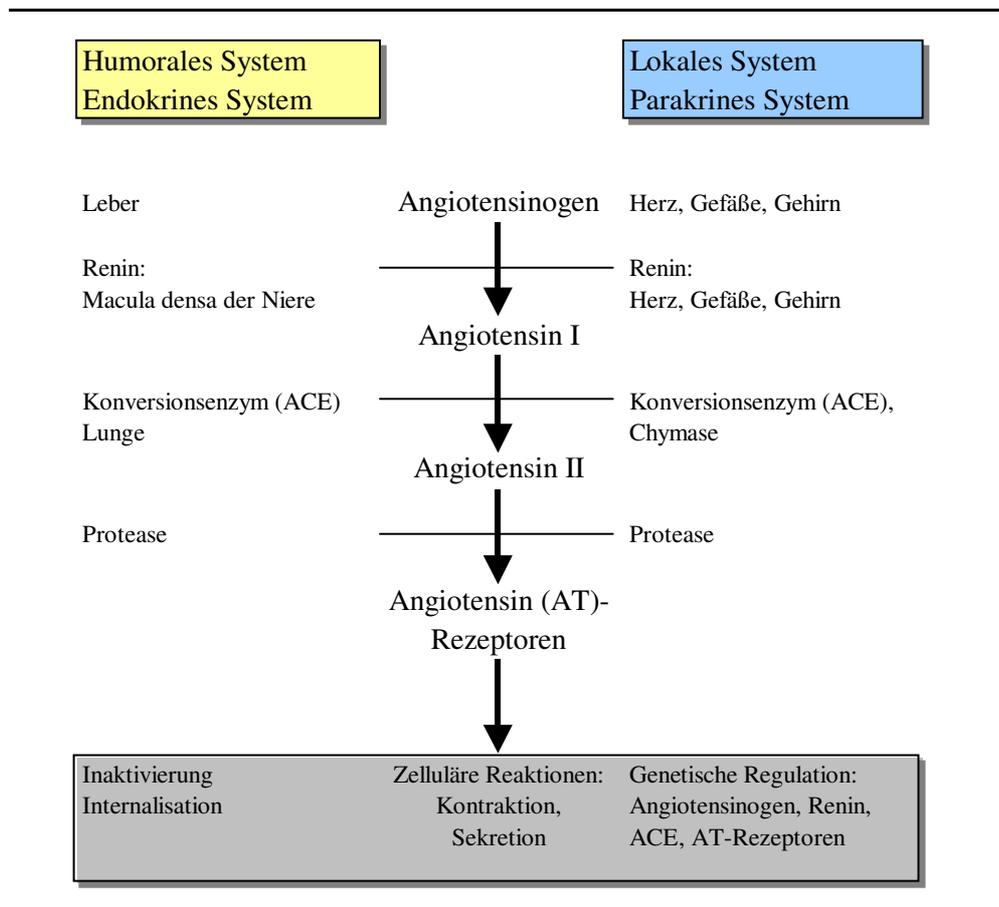


Abbildung 1: Dargestellt ist das systemische, humorale RAAS (gelber Hintergrund) und das lokale parakrine RAAS (blauer Hintergrund) [27]; Michel *et al.* konnten zeigen, dass unterschiedliche Konzentrationen von ACE nicht nur in unterschiedlichen Organen zu messen sind, sondern dieses auch in den einzelnen Kompartimenten eines Organs vorhanden ist. So besitzt in der Niere die „renal brush boarder“ die höchste Konzentration an ACE im Vergleich zum Nierenmark. Diese Konzentrationen variieren in unterschiedlichem Ausmaß bei Proteinbelastung, so dass die These eines lokalen RAAS wahrscheinlich ist [59]. Untersuchungen bei einer diabetischen Stoffwechsellage haben gezeigt, dass lokal in den einzelnen Kompartimenten der Niere erhöhte Ang II-Konzentrationen vorliegen. Dies könnte ebenfalls auf ein lokales Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) deuten [42;50]. Vor diesem Hintergrund wird deutlich, wie komplex das Interferenzmuster durch Pharmaka wie ACE-Hemmer und AT1-Antagonisten ist.

Ang II fördert die Aldosteron-Inkretion aus der Nebennierenrinde. Das Mineralokortikoid Aldosteron hält in der Niere Natrium-, Chloridionen und Wasser zurück und führt somit zur Vermehrung des Blutvolumens. Auf der anderen Seite wird durch Aldosteron die Kaliumionen- und Wasserstoffionenausscheidung gefördert. Ang II hält durch verschiedene Mechanismen einen Bluthochdruck aufrecht (Abbildung 2), wie beispielsweise lokale Vasokonstriktion und Sympathikusaktivierung. Darüber hinaus erhält Ang II besondere Aufmerksamkeit als möglicher Wachstumsfaktor oder Modulator, der entscheidend zu progressiven pathologischen Veränderungen im Rahmen einer GN am Nephron führt. Ang II wird durch Peptidasen inaktiviert. Das ACE ist nicht nur spezifisch für Angiotensin I, sondern kann auch Bradykinin inaktivieren. Bradykinin bewirkt eine Vasodilatation und Kapillarpermeabilitäts-erhöhung. Das ACE befindet sich auf der luminalen Seite des Gefäßendothels. Reich an ACE ist die Lunge, aber auch im Gefäßgebiet anderer Organe ist das Enzym vorhanden [7;46]. Bei völliger Hemmung des ACE kann im Gefäßsystem Ang II aus seiner inaktiven Vorstufe durch weitere Enzyme (Chymase, CAGE, Cathepsin G, t-PA (Plasminogenaktivator)) entstehen (Abbildung 2).

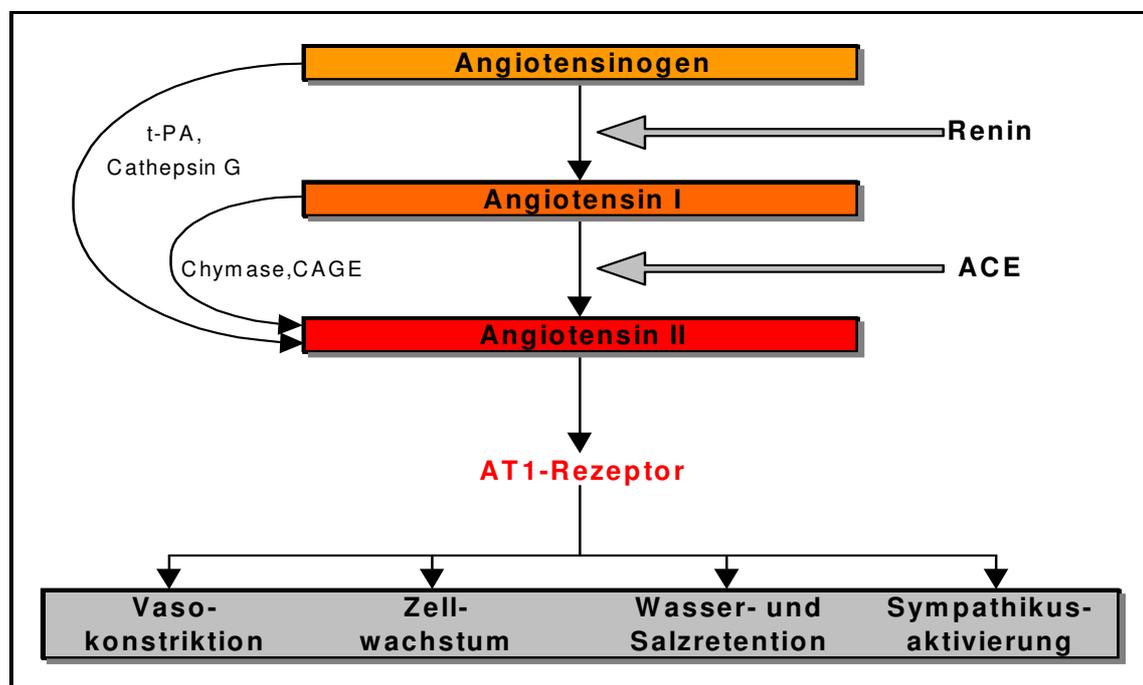


Abbildung 2: Darstellung des RAAS mit möglichen Enzymen, die zur Spaltung des Angiotensinogens bzw. Angiotensin I befähigt sind [27]

Die Wirkung von freigesetztem oder appliziertem Angiotensin I geht damit nicht gänzlich verloren, wie es der Fall ist, wenn die Angiotensin-Rezeptoren durch spezifische

Hemmstoffe (AT1-Rezeptor-Antagonisten) total blockiert sind (Abbildung 4). Dies mag auch bedeutsam sein in Bezug auf ein „lokales“ RAAS.

Das Glomerulum besteht aus vier Hauptzellen: Epithel-, Endothel-, kontraktile Mesangium- und aus dem Knochenmark stammenden Mesangiumzellen. Das Arbeiten mit definierten Populationen glomerulärer Zellen unter kontrollierten Kulturbedingungen erlaubt die Mechanismen einer Glomerulonephritis (GN) in einer mehr direkten und spezifischen Art und Weise zu untersuchen als *in vivo*. Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit modellhaft die Stimulation von Mesangiumzellen aus einer Rattenzellkultur simuliert, um die Bedeutung und Auswirkung des Renin-Angiotensin II-Aldosteron-Systems und seiner Beeinflussung durch den ACE-Hemmer Ramiprilat und den AT1-Antagonisten Valsartan im Hinblick auf die Pathogenese von GN beurteilen zu können. Die intraglomerulären Mesangiumzellen sind zwischen benachbarten Kapillaren von der Basalmembran im Glomerulus eingeschlossen. Sie sind zur Phagozytose des Basalmembranmaterials befähigt, das von den Podozyten laufend neu gebildet wird (Abbildung 3).

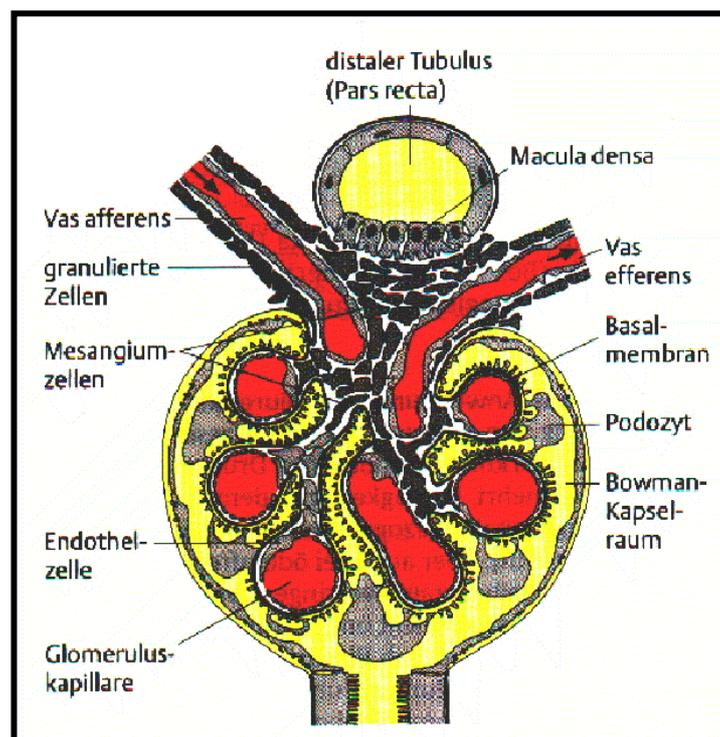


Abbildung 3: Aufbau eines Glomerulus mit Darstellung der einzelnen Zelltypen und anatomischen Strukturen [53]

Glomeruläre Mesangiumzellen sind mesenchymalen Ursprungs und regulieren die glomeruläre Filtrationsrate durch Veränderung ihrer Kontraktilität. Sie besitzen ferner eine formerhaltende Funktion für die kapillären Schlingen des Glomerulus durch Produktion von extrazellulären Matrix-Komponenten, wie z.B. Kollagen und Fibronectin [2]. Eine Störung der mesangialen Zellhomöostase führt daher auch zu einer Veränderung der effektiven glomerulären Filtrationsbarriere, die Folgen können vermehrte Eiweißausscheidung oder ein Abfall der glomerulären Filtrationsrate sein.

Die Affinität von Ang II zu seinen Rezeptoren ist sehr hoch. Beim gesunden Menschen scheint vorwiegend der Rezeptor vom AT1-Typ vorzukommen, der AT2-Typ ist bei der Ratte, der Maus, dem Rind, im menschlichen Gehirn und im fetalen oder erkrankten Gewebe nachweisbar [39].

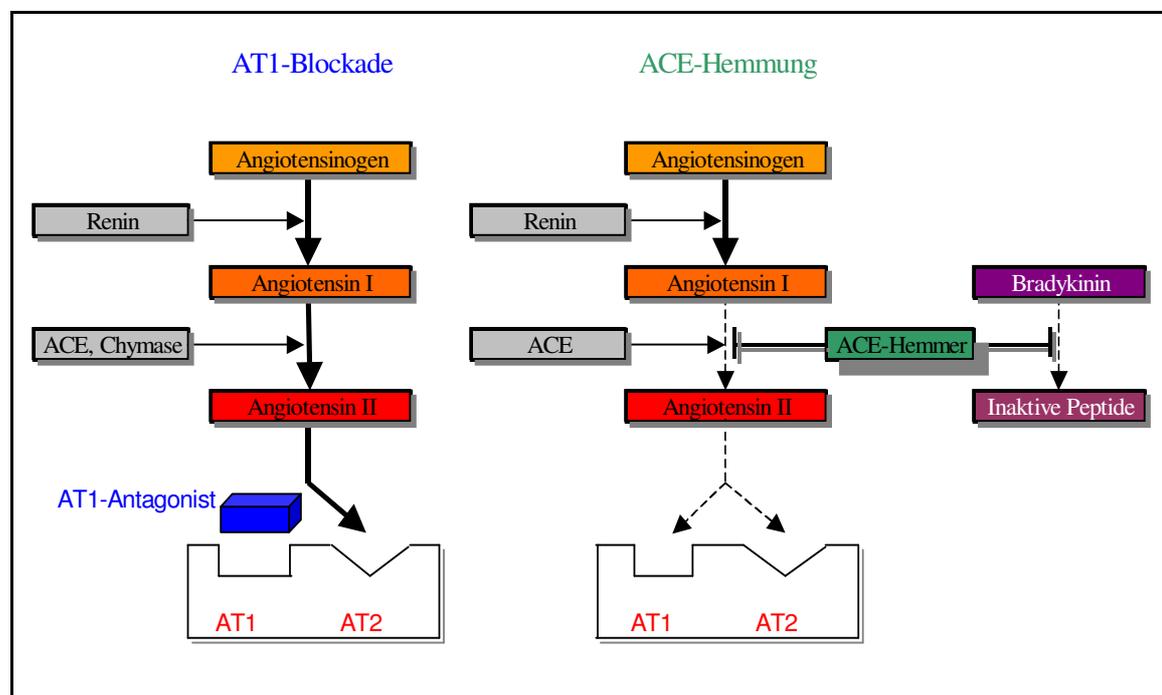


Abbildung 4: Darstellung der Wirkweise eines ACE-Hemmers und eines AT1-Antagonisten auf das RAAS [27]. Bei vollständiger Blockade des AT1-Rezeptors kann es möglicherweise zur verstärkten Stimulation des AT2-Rezeptors kommen. ACE-Hemmer inhibieren sowohl die Spaltung von Angiotensin I zu Angiotensin II, als auch die Spaltung des Bradykinins zu inaktiven Peptiden.

Die Durchbrechung des RAAS durch Pharmaka wie ACE-Hemmer und AT1-Antagonisten stellt eine entscheidende therapeutische Option zur Verlangsamung einer Niereninsuffizienz mit progredienter Glomerulosklerose dar (Abbildung 4).

Der ACE-Hemmer Ramiprilat ist ein aktiver Metabolit des in der Leber umgewandelten ACE-Hemmers Ramipril. Die Ausscheidung des Ramiprilats erfolgt hauptsächlich über die Niere, so dass eine starke Abhängigkeit zur Kreatinin-Clearance besteht [21;75].

Mehrere klinische Studien, in denen die Wirkung der ACE-Hemmer im Hinblick auf Glomerulonephritiden untersucht wurde, deuten darauf hin, dass diese eine günstige, „nephroprotektive“ Wirkung auf die Niere haben, die über die Wirkung einer alleinigen Blutdrucksenkung hinaus gehen.

So zeigte beispielsweise die „REIN-Studie“ (Ramipril Efficacy In Nephropathy) bei der chronischen nicht-diabetisch bedingten Nephropathie (mit einer Proteinurie $> 3\text{g}/24\text{h}$), dass der ACE-Hemmer Ramipril die Eiweißausscheidung und einen Abfall der glomerulären Filtrationsrate gegenüber einer Placebo-plus-konventionellen-Therapie behandelten Kontrollgruppe signifikant reduziert [73;85]. In der „REIN follow-up“ Studie zeigte sich eine sogar noch verstärkte Senkung der GFR und Limitierung der Progression bis zum Nierenversagen, als bereits in der vorausgehenden „REIN-Studie“ beobachtet [69].

Die „AASK-Studie“ (African American Study of Kidney Disease and Hypertension) bewies weiterhin, dass bei Patienten mit hypertensiver Nierenerkrankung und Proteinurie im Vergleich zu Amlodipin die Progression der Nierenerkrankung durch Verwendung von Ramipril signifikant verzögert wurde [1].

Eine Senkung der Todesrate, der Myokardrate und des Schlaganfalls zeigte die „HOPE-Studie“ (Heart Outcomes Prevention Evaluation) bei Patienten mit hohem Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse und Diabetes mellitus mit Ramipril gegenüber Placebo auf [86].

Der AT₁-Antagonist Valsartan hemmt kompetitiv und selektiv die Wirkung von Ang II am AT-Angiotensin II-Rezeptor Typ1 [15];[13];[14] (Abbildung 5). Die „RENAAL Studie“ zeigte, dass Losartan bei Patienten mit Typ II Diabetes in Vergleich zu Patienten behandelt mit einer konventionellen antihypertensiven Therapie das Risiko für eine kardiorenale Progression (wie Nierenversagen) signifikant reduziert [47;77]. Die CHARM (Candesartan in Heart failure-Assessment of Reduction in Mortality and morbidity)-Studie untersucht an Patienten mit Koronarer Herz Krankheit den AT₁-Antagonisten Candesartan auf Reduktion der Mortalität und Morbidität mit niedriger Links-Ventrikulärer-Ejektions-Fraktion gegenüber drei Kontrollgruppen (1. mit ACE-Hemmer-Behandlung, 2. mit ACE-Hemmer-Intoleranz, 3. unter herkömmlicher antihypertensiver Therapie). Die Auswertung dieser Studie steht noch aus [83]. Eine

„nephroprotektive“ Wirkung wies der AT1-Antagonist Losartan durch eine Senkung der Albuminurie und Proteinurie bei Nephropathie bei älteren Patienten mit oder ohne nicht-insulinpflichtigem Diabetes mellitus auf [20;23]. Plum *et al.* zeigten bei Patienten mit chronischem Nierenschaden während 6-monatiger Behandlungsdauer mit dem AT1-Antagonisten Valsartan eine Verminderung der Proteinurie bei gleichbleibender GFR gegenüber einer Kontrollgruppe, die mit Placebo behandelt wurde [66].

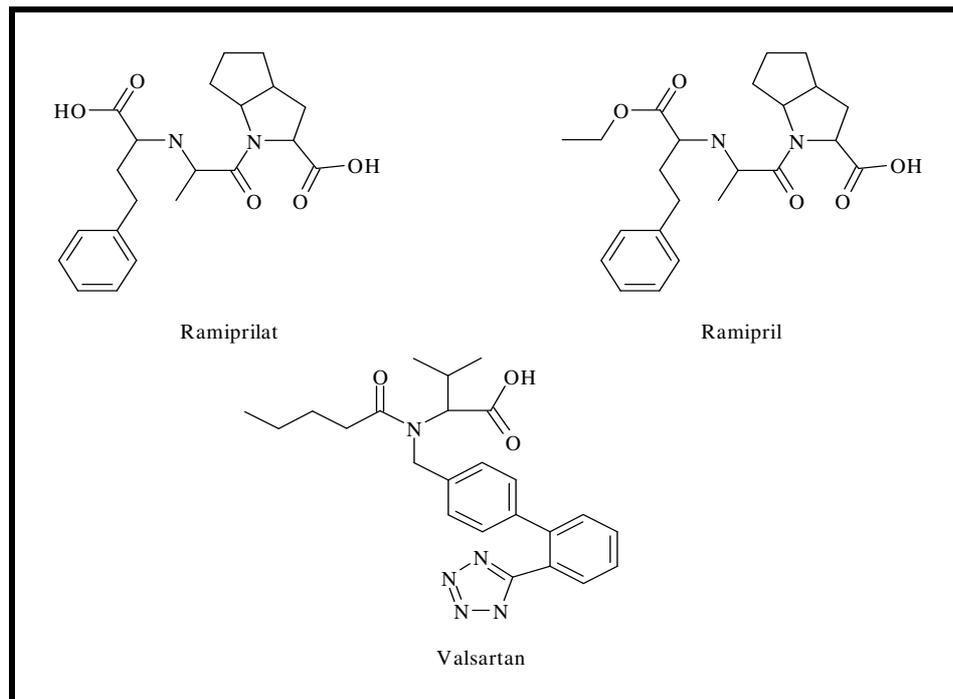


Abbildung 5: Strukturformeln der Medikamente Ramiprilat, Ramipril und Valsartan

Der genaue Wirkungsmechanismus der Pharmaka ist derzeit Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Insbesondere muss geklärt werden, inwieweit durch die unterschiedlichen Blockierungsmechanismen der Pharmaka der AT1- und AT2-Rezeptor beeinflusst und somit die folgenden molekularen Wirkungsmechanismen innerhalb der Zelle verändert werden (Abbildung 6). Die Bedeutung des AT2-Rezeptors scheint noch nicht vollständig geklärt. AT2-Antagonisten zeigen in Versuchen an mesenterialen Zellen erwachsener Ratten keine Wirkung, während Zellen junger Tiere eine signifikante Reduktion Ang II-induzierter Kontraktionen auslösen [87]. Auch am Herzen kommt es zur AT2-Rezeptor-Expression. Der Einsatz eines alleinigen AT2-Antagonisten (PD123319) zeigt keine Auswirkung auf eine Verbesserung der linksventrikulären Herzfunktion oder der linksventrikulären Ejektionsfraktion an Ratten, hingegen scheinen AT2-Antagonisten zusammen mit vollständiger Blockade der AT1-Rezeptoren

(L158809) eine Abschwächung der AT1-Wirkung auszulösen [51]. Manche Autoren sprechen von einem „pro-apoptotischen“ Effekt des AT2-Rezeptors, der jedoch von einem „anti-apoptotischen“ Effekt, der vom AT1-Rezeptor ausgeht, dominiert wird [6]. Andere sprechen von einem „anti-proliferativen“-Effekt des AT2-Rezeptors. So auch Wolf *et al.*, die eine „down-regulation“ des Gens SM-20 bei Stimulation des AT2-Rezeptors bei einer Ratten-Phäochromozytom-Zelllinie zeigten. Das Gen „SM-20“ wird verstärkt bei Stimulation mit Mitogenen exprimiert [91]. AT2-Rezeptoren bewirken ebenfalls eine Vasodilatation, möglicherweise direkt über Freisetzung von NO oder indirekt durch Freisetzung von Kininen [51]. Seine unterschiedliche Wirkweise an den verschiedenen Zelltypen mag mitunter durch das komplizierte Verschachtelungsmuster des systemischen und lokalen RAAS mit bedingt sein. Ang II beeinflusst das zelluläre Wachstumsverhalten über verschiedene Wirkmechanismen. Diese sollen hier Ansatzweise wiedergegeben werden (Abbildung 6): 1.) Direkte Stimulation des AT1-Rezeptor mit nachfolgender Konformationsänderung eines G-Proteins führt über Aktivierung der Phospholipase C zu Hydrolyse von Phosphoinositolbiphosphat mit den resultierenden second messenger Inositoltriphosphat (IP3) und Diacylglycerin (DAG). IP3 führt zur Erhöhung intrazellulären Calciums mit nachfolgender Aktivierung Calcium-abhängiger Kinasen. DAG aktiviert eine Proteinkinase 3 (PK3). Beide beschriebenen Wege führen zu wachstums-fördernden Effekten des Ang II. 2.) Ang II stimuliert die Expression von anderen Wachstumsfaktoren wie PDGF-A und B, ET-1; FGF, IL-1, TGF- β und HBEGF [37;41;61;84;88]. 3.) Erhöhte ROS (reactive oxygen species)-Aktivierung führt über eine Stimulation der NADPH-Oxidase zur Bildung von Superoxid-Anionen und Wasserstoffperoxid-Formationen. Diese Superoxid-Anionen aktivieren MAP-Kinasen, die zu Zellwachstum führen [25;40;54]. 4.) Neuere Untersuchungen weisen auf die Bedeutung der Tyrosin-Kinasen bei durch Ang II ausgelöstem Zellwachstum hin [38]. Diese an Wachstumsfaktor-Rezeptoren-gekoppelten Kinasen (z.B. PDGF-Rezeptor, EGF-Rezeptor) führen zur Aktivierung der nachfolgenden Signalkaskaden der Wachstumsfaktoren. Für eine große Anzahl von Tyrosin-Kinasen wurde eine Aktivierung durch Ang II nachgewiesen. Dazu gehört beispielsweise die „Src-Kinase“-Familie und die „Janus-Kinasen“ [6;28]. Qureshi *et al.* zeigten an Mäuse-Fibroblasten, dass die Tyrosin-Kinase „v-Src“ den Transkriptionsfaktor Egr-1 über ein „serum response element“ aktiviert [12;67]. Ebenso zeigten Molnar *et al.*, dass Egr-1 die Aktivität des Thymidin-Kinase-Promotors an dem G0-zu-G1-Transit reguliert [60].

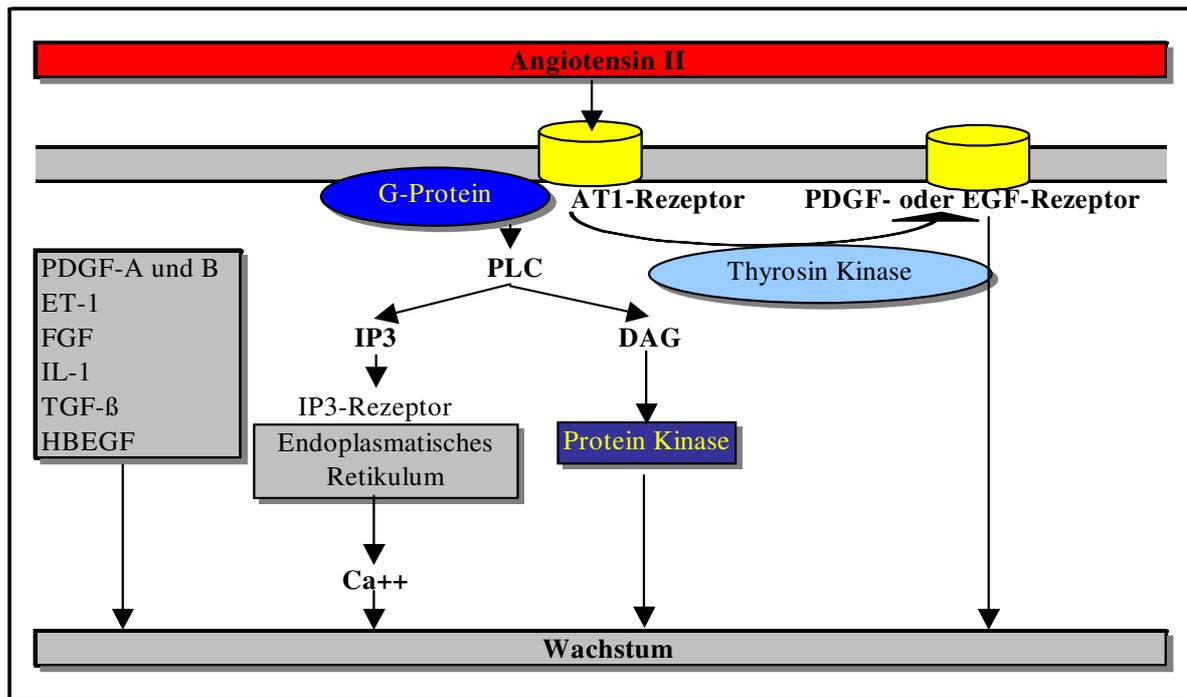


Abbildung 6: Durch Ang II ausgelöste intrazelluläre Signal-Transduktion in der Zelle.

Zahlreiche Untersuchungen zeigten, dass eine enge Korrelation zwischen Proliferation von kultivierten Mesangiumzellen und „early growth response gene-1“ besteht [35;37;70-72]. Das Egr-1 ist ein Transkriptionsregulator, der DNA durch drei Zinkfinger Domänen zubinden vermag und ein nukleäres, 80 kDa großes, kurzlebiges Phosphoprotein kodiert [8;11;64]. Es wird, so wie das C-fos, C-myc und C-jun, zur Familie der „immediate early gene“ gezählt und ist auch unter den Namen „zif268“, „Krox 24“, „TIS 8“ oder „NGFI-A“ bekannt. Es wird hauptsächlich durch verschiedene mitogene (z.B. PDGF, Endothelin-1, Fibroblasten Wachstumsfaktor...) aber auch durch vasoaktive Faktoren (z.B. Serotonin, Vasopressin,...) während des Transits von der G0 in die G1-Phase induziert [11;35;71], wenn die Zelle in den Zellzyklus eintritt [60]. Antiproliferative Substanzen hingegen, wie beispielsweise s-Nitrosoglutathion (GSNO), hemmen die Egr-1-Expression [8;70;82]. Ein Zusammenhang zwischen der Egr-1-Expression und einer proliferativen Glomerulonephritis scheint somit wahrscheinlich. Dies zeigt Rupprecht *et al.* an einem Modell einer induzierten mesangioproliferativen GN (anti-Thy-1 Nephritis) der Ratte anhand einer verstärkten Egr-1-Gen-Expression [4;72]. Hofer *et al.* demonstrierten durch Inhibition von Serum-induzierter Egr-1-Expression durch „antisense Oligonukleotide“ sowohl eine Reduktion des Serum-induzierten-egr-1 auf mRNA- und Protein-Ebene als auch eine Reduktion der MZ-Proliferation. Der Effekt der

„antisense Oligonukleotide“ auf MZ-Proliferation korrelierte eng mit der Fähigkeit derselben zur Hemmung des Egr-1-Proteins.

Egr-1 stimuliert die Expression anderer spezifischer Gene, deren Bedeutung, Auswirkung und Ineinandergreifen derzeit untersucht wird. Beispielsweise spielt Egr-1 eine wichtige Rolle bei der Regulation der Immunantwort. Perez-Castillo *et al.* wiesen einen Egr-1-Geneinfluss auf die Proliferation und Regulation von T-Lymphozyten nach [65]. Auch kodiert Egr-1 einen spezifischen Transkriptionsfaktor, der notwendig ist für eine Antigen-Rezeptor stimulierte Aktivierung von B-Lymphozyten [56]. Eine erhöhte Egr-1-Expression unter Cytokin- und Antigen-Einfluss am Immunsystem wurde ebenso nachgewiesen [57]. Sells *et al.* zeigten an Melanom-Zellen eine Assoziation zwischen Induktion des Egr-1-Gens und der Aktivität des Cytokins Interleukin-1 [76].

Eine Egr-1-Expressionszunahme zeigte sich auch als zelluläre Antwort auf Bestrahlung. Wahrscheinlich spiegelt dies die erhöhten Reparaturvorgänge innerhalb der Zelle nach Zellschädigung durch Strahlung wider.

Insgesamt stellt Egr-1 offenbar eine Schlüsselfunktion bei der Vorbereitung der Zelle auf bevorstehende Wachstumsprozesse wie Zellproliferation und -hypertrophie dar.

2 Hypothese und Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es, am Modell der Mesangiumzellen der Ratte die Bedeutung des RAAS in Hinblick auf einen möglichen Pathomechanismus im Rahmen einer GN zu eruieren. Dabei wurde die These untersucht, ob Ang II bei Mesangiumzellen eine Zellproliferation (Hyperplasie mit einem Anstieg der Zellzahl), eine Zellhypertrophie (Anstieg der Zellgröße ohne Änderung des DNA-Gehalts) oder Endoreduplikation (ein Anstieg im DNA-Gehalt mit meistens folgender Zellgrößenzunahme) bewirkt und diese Veränderungen zu pathologischen Auswirkungen am Glomerulus führen. Weiterhin wurde untersucht, ob diese pathologischen Veränderungen durch einen ACE-Hemmer oder einen AT1-Antagonisten gehemmt bzw. aufgehoben werden können. Besondere Aufmerksamkeit bekam dabei der ACE-Hemmer Ramiprilat und der AT1-Antagonist Valsartan. Deren Einfluss wurde auf mehreren Ebenen systematisch untersucht: Zur Messung der Zellviabilität wurde der MTT-Test verwendet, zur Beurteilung der DNA-Synthese diente der BrdU-Test, die Toxizität wurde im LDH-Test ermittelt, der Proteingehalt und damit die Zellhypertrophie wurde nach der Bradford-Methode

bestimmt, zur Beurteilung der Zellmorphologie wurden die Zellen mit Hämatoxylin gefärbt und anschließend im Phasenlichtmikroskop beurteilt. Die Genexpression des Egr-1-Gens als Transkriptionsfaktor und Regulator von Zellwachstum wurde anhand einer semiquantitativen PCR bestimmt.

3 Material und Methoden

3.1 Material und Geräte

Material:

Bestandteile der Nährmedien:

„RPMI 1640 with Glutamax-1“; 25 mM HEPES	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
„Dulbecco`s MEN with Glutamax-1“; 4,5 g/l Glukose	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
„Penicillin-Streptomycin-Lösung“	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
„Fetal Calf Serum“	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Insulin	Sigma, Steinheim, Deutschland
„PBS-Dulbecco“	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
„Trypsin EDTA“	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
„Bovine Serum Albumin“ (BSA)	Sigma, Steinheim, Deutschland

Stimulanzen und Pharmaka:

Angiotensin II	Sigma, Steinheim, Deutschland
Valsartan	Novartis, Nürnberg, Deutschland
Ramiprilat	Aventis Pharma, Frankfurt/Main, Deutschland

MTT-Test:

„MTT-Lösung“	Sigma, Steinheim, Deutschland
„Solubilisations-Lösung“ (SDS)	Sigma, Steinheim, Deutschland

BrdU-Test:

„Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)“	Boeringer, Mannheim, Deutschland
---	----------------------------------

Proteinisolierung:

Tris-HCl	Merck KG, Darmstadt, Deutschland
EDTA	Merck KG, Darmstadt, Deutschland
EGTA	Merck KG, Darmstadt, Deutschland
„Triton X-100“	Fluka BioChemika, Schweiz
Leupeptin	La Roche, Mannheim, Deutschland
PMSF	La Roche, Mannheim, Deutschland
DTT	Gibco BRL, Deutschland

LDH-Test:

„Cytotoxicity Detection Kit“	Boeringer, Mannheim, Deutschland
------------------------------	----------------------------------

RNA-Isolierung:

„RNeasy Mini Kit“ Qiagen, Hilden, Deutschland
 β-Mercaptoethanol Merck KG, Darmstadt, Deutschland

Reverse Transkriptions-Reaktion:

„First Strand Buffer“ Gibco BRL, Deutschland
 dNTP Amersham Pharmacia Biotech Inc, USA
 DTT Sigma, Steinheim, Deutschland
 „Random Primer“ Amersham Pharmacia Biotech Inc, USA
 „BSA“ Amersham Pharmacia Biotech Inc, USA
 „RNasin Ribonuklease Inhibitor“ Promega, Madison, USA
 „DNase“ Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
 Reverse Transkriptase Gibco, Karlsruhe, Deutschland

PCR:

„10xPuffer“ Qiagen, Hilden, Deutschland
 dNTP La Roche, Mannheim, Deutschland
 Oligonukleotide für die RT-PCR Interactiva, Düsseldorf, Deutschland
 Taq „HotStar“ Qiagen, Hilden, Deutschland
 Agarose Merck KG, Darmstadt, Deutschland
 Ethidiumbromid Merck KG, Darmstadt, Deutschland
 TAE-Puffer Merck KG, Darmstadt, Deutschland

Weitere Chemikalien

Merck KG, Darmstadt, Deutschland

Geräte:

Für MTT-, BrdU-, LDH-Test:

"ELISA Reader SLT 400 ATC"

Für Proteingehaltbestimmung:

"ELISA Reader Beckmann"

Für RNA-Isolierung:

"Spectrometer Lambda Bio" Perkin Elmer, Düsseldorf, Deutschland

Für RT-Reaktion und PCR:

"Master Cycler Gradient Eppendorf" Eppendorf, Deutschland
 "Biometra Personal Cycler" Biometra, Göttingen, Deutschland

Sonstige Laborgeräte:

"Biofugefresco" Heraeus, Hanau, Deutschland
 "Megafuge 1.0" Heraeus, Hanau, Deutschland
 "Heracell" Inkubator Heraeus, Hanau, Deutschland

3.2 Zellkultur und Zellzahlbestimmung

Um die Wirkung der Ang II auf die Niere zu untersuchen, wurden Mesangiumzellen der Ratte verwendet. Es handelt sich hierbei um eine klonierte Zelllinie, die freundlicherweise der Arbeitsgruppe vom Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt/Main (Direktor: Prof. Dr. J. Pfeilschifter) zur Verfügung gestellt wurde.

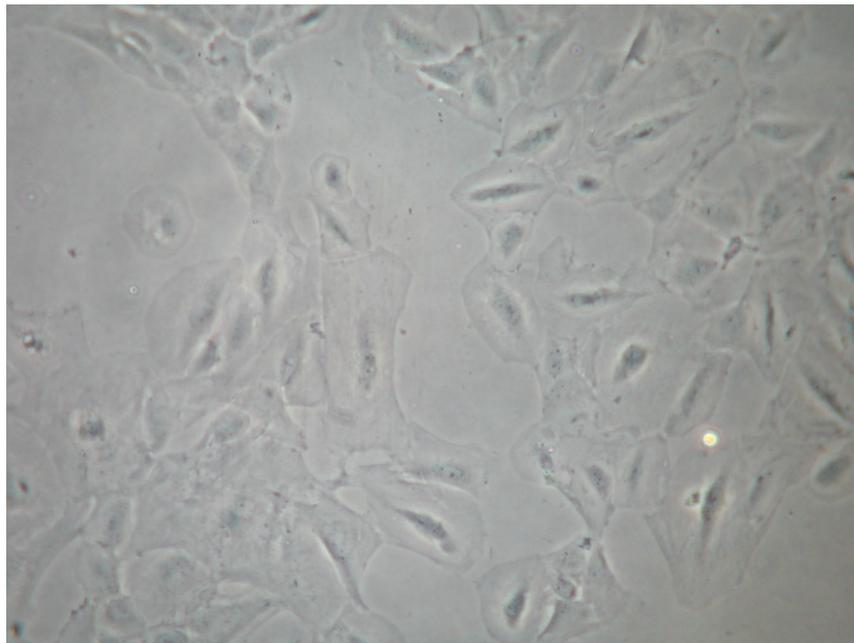


Abbildung 7: Repräsentative Darstellung nativer Mesangiumzellen mittels Phasenkontrastmikroskop; 100 x Vergrößerung

Die Mesangiumzellen wurden für jeden im Folgenden beschriebenen Versuchsansatz unter den gleichen Grundbedingungen (37 °C, 5 % CO₂, Passage und Behandlung der Zellen unter einer Sterilbank) vorbereitet. Es wurden Zellen der Passagen 14 bis 18 benutzt. Zur Kultivierung der Zellen wurde ein Nährmedium (Medium 1) der folgenden Zusammensetzung verwendet:

Nährmedium (Medium 1):

"RPMI 1640 with Glutamax-1"; 25 mM HEPES
"Penicillin-Streptomycin-Lösung"; Penicillin 100 U/ml; Streptomycin 100 µg/ml
"Fetal Calf Serum" (FCS) 10 %
Insulin 5 µg/ml

Die Zellen wurden alle drei Tage unter einem Lichtmikroskop hinsichtlich der Konfluenz und dem Wachstumsverhalten begutachtet. Das Nährmedium wurde alle drei Tage ausgetauscht. Das Ernten der Mesangiumzellen erfolgte jeweils bei Subkonfluenz durch enzymatisch proteolytisches Ablösen mit Trypsin. Dazu wurde das Nährmedium entfernt und die Zellen mit 10 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. 5 ml „Trypsin EDTA“ wurden dazugegeben und die Zellen im Brutschrank für eine Minute zur Reaktionsbeschleunigung inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde unter dem Mikroskop kontrolliert und die enzymatische Reaktion des Trypsins mit 10 ml Nährmedium (Medium 1) gestoppt (α -Chymotrypsin als Bestandteil des FCS deaktiviert das Trypsin). Die Zellsuspension wurde für fünf Minuten bei 1.000 U/min (RT) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das so gewonnene Zellpellet wurde in 10 ml frischem Nährmedium resuspendiert.

Material zum Passagieren:

"PBS-Dulbecco"
"Trypsin EDTA"
Nährmedium (Medium 1)

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 μ l der oben beschriebenen Zellsuspension entnommen, mit 10 μ l Trypanblau (0,4 %) gefärbt und in einer Neubauer Zählkammer gezählt. Die Färbung der Zellen mit Trypanblau ermöglicht die Unterscheidung toter und lebender Zellen. Tote Zellen weisen Membrandefekte auf und stellen sich in dunklem Blau dar, lebende Zellen sind nicht gefärbt. Gezählt wurden lebende Zellen. Die ermittelte Zellzahl wurde mit 2 (Verdünnungsfaktor der Zellsuspension mit Trypanblau), mit 10 (Volumen in dem die Zellen resuspendiert sind) und mit 10.000 (Kammerfaktor) multipliziert, um die Gesamtzellzahl der Zellsuspension zu erhalten. Ausgehend von der so ermittelten Zellzahl wurden die für den jeweiligen Versuchsansatz erforderlichen Verdünnungen hergestellt.

3.3 Aussaat, Synchronisation und Stimulation der Mesangiumzellen

Nachdem die Mesangiumzellen auf die Zellkulturplatten ausgesät wurden, wurden sie bis zur Adhärenz über 24 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zur Synchronisation der Zellzyklen („growth arrest“) über weitere 24 h in ein sogenanntes „Minimal“ Medium (Medium 2) umgesetzt.

Medium zur Synchronisation der Zellen (Medium 2):

Dulbecco`s MEN with Glutamax-1	4,5 g/l Glukose
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Penicillin 100 U/ml; Streptomycin 100 µg/ml
Bovine Serum Albumin	(BSA) 0,01 %

Vor der Stimulation unter den verschiedenen Versuchsbedingungen wurden die Zellen auf das Nährmedium (Medium 3) umgesetzt.

Medium zur Stimulation (Medium 3):Medium 3:

"Dulbecco`s MEN with Glutamax-1"	4,5 g/l Glukose
Bovine Serum Albumine (BSA)	(BSA) 0,1 mg/ml
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/ml
Fetal Calf Serum (FCS)	0,25 % wurde zugegeben vor MTT, BrdU, LDH, Proteingehaltbestimmung, Fotografieren 0,4 % wurde zugegeben vor RNA-Isolierung

Stimulantien und Pharmaka:

Angiotensin II	0,1 µM; 1 µM; 10 µM
Valsartan	0,01 µM; 0,1 µM; 1 µM; 10 µM
Ramiprilat	0,1 µM; 1 µM; 10 µM; 100 µM

Der Agonist Angiotensin II wurde in PBS mit 0,1 % Rinderserumalbumin (BSA) gelöst und in den Konzentrationen 0,1 bis 10 µM zugegeben. Der AT1-Rezeptor-Antagonist Valsartan wurde in 96 % Ethanol gelöst und lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt. 0,1 N Natronlauge diente dem ACE-Hemmer Ramiprilat als Lösungsmittel. Auch dieses wurde lichtgeschützt bei 4 °C gelagert. Das Ramiprilat wurde in Konzentrationen zwischen 0,1 bis 100 µM eingesetzt und beim Valsartan wurden Konzentrationen zwischen 0,01 bis 10 µM verwendet. Beide wurden synchron mit dem Angiotensin II zur Stimulation zugesetzt, mit Ausnahme der Proteingehaltbestimmung. Bei der Proteingehaltbestimmung wurde mit beiden Pharmaka einstündig vorinkubiert.

Die mit Ang II und gegebenenfalls einem der beiden Pharmaka behandelten Zellen wurden über 3, 4, 5 und 7 Tage stimuliert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle drei Tage. Es wurden unbehandelte Kontrollen mitgeführt, bei denen das Medium die vergleichbaren Zusätze an FCS und für die Testung der Pharmakawirkung jeweils das Lösungsmittel enthielt.

3.4 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Test

Der MTT-Assay stellt einen Proliferationstest dar und misst die Viabilität der Zellen anhand der Atmungsaktivität der Mitochondrien. Der Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) gelangt in die metabolisch aktive Zelle und wird dort durch das zelluläre NADH und das NADPH reduziert, so dass er zu dem purpurroten Formazansalz auskristallisiert. Die Kristalle werden durch Zugabe einer Solubilisierungs-Lösung aufgelöst. Die Färbung der Lösung wird anschließend photometrisch mit dem ELISA-Reader gemessen. Die Anzahl der Zellen bzw. des gebildeten Formazansalzes korreliert mit der Höhe der optischen Dichte ($\lambda = 550 \text{ nm}$; Referenzwellenlänge $\lambda = 690 \text{ nm}$).

Materialien für den MTT-Test:

MTT-Lösung (5 mg/ml):

Solubilisierungs-Lösung (SDS): 50 g SDS werden mit 500 ml 0,01 M Salzsäure verdünnt

Für den MTT-Test wurden pro Ansatz 1×10^3 Zellen in 96-well Platten ausgesät und durch „growth arrest“ synchronisiert.

Zu den jeweiligen Bestimmungszeitpunkten (3 und 5 Tage) wurden jeweils $N = 6$ Proben mittels MTT ausgewertet. Es wurde jeweils ein sogenannter „Leerwert“ ohne Zellen mitgeführt, der in der Auswertung der Photometrie als Basalwert und somit als Korrekturfaktor diente. Als Kontrolle wurde weiterhin ein Versuchsansatz mit Zellen, die mit 10 % FCS-Medium behandelt wurde, als „maximaler Proliferationswert“ sowie Zellen, die nur mit Medium 3 behandelt wurden, als „Nullwert“, oder „minimaler Proliferationswert“ durchgeführt.

Es wurden aufsteigende Konzentrationen an Ang II (0,1 μM ; 1 μM ; 10 μM) mit und ohne Zugabe der Pharmaka Valsartan (0,01 μM ; 0,1 μM ; 1 μM ; 10 μM) und Ramiprilat (0,1 μM ; 1 μM ; 10 μM ; 100 μM) mit jeweils 100 μl /well zur Stimulation zugegeben. Für jede Probe wurden $N = 6$ Ansätze ausgewertet und daraus der Mittelwert gebildet. Die Dauer der Stimulation betrug drei bzw. fünf Tage. Ein Mediumwechsel erfolgte am dritten Tag.

Vier Stunden vor Ende der Stimulation wurden 10 µl der MTT-Lösung pro Probe hinzugefügt und daraufhin die Proben für diese Zeit bei 37 °C inkubiert. Jeweils 100 µl der Solubilisierungs-Lösung wurden zu jeder Probe gegeben und im Brutschrank über Nacht belassen. Am nächsten Tag wurden die Zellproben mit Hilfe des ELISA photometrisch ausgewertet.

3.5 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)-Test

Vergleichbar mit dem (³H)-Thymidin-Einbau basiert dieser Proliferationstest auf der Messung des Einbaus des 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU). Hierbei wird das Pyrimidin-Analogon BrdU anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut. Antikörper, die am BrdU angreifen und farblich mit einer Substratlösung reagieren, können so photometrisch gemessen werden. Der BrdU-Einbau verhält sich proportional zur DNA-Synthese.

Materialien für den BrdU-Test:

Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) für eine 96-well-Platte:

"FixDenat"	20 ml
"BrdU labeling solution"	20 µl BrdU in 2 ml sterilem Kulturmedium (Medium 2) frisch aufgelöst
"Anti-BrdU-POD-Stock-solution"	110 µl
"Antibody-dilution solution"	11 ml; kurz vor Gebrauch mit
"Anti-BrdU-POD-Stock-solution"	zusammen geben
Waschlösung	10 ml konzentrierte Waschlösung mit 90 ml <i>Aqua dest.</i> verdünnen
"Blockierungsreagenz"	11 ml
Schwefelsäure	1 molar; 25 µl/well

Pro Test wurde eine Zellzahl von 2×10^4 Zellen/well ausgesät. Nach Synchronisation und 24 stündiger Zelladhärenz, folgte die Stimulation. An Kontrollen wurden ein „Background Minimum“ unter Zugabe von Medium 3 sowie ein „Background Maximum“ unter Zugabe von 10 % FCS mit N = 3 Versuchsansätzen durchgeführt. Bei beiden Kontrollen wurde auf die Zugabe von „BrdU labeling solution“ verzichtet. So sollte geprüft werden, ob der Antikörper keine unspezifischen Bindungen eingeht. Stimuliert wurde mit steigenden Konzentrationen von Angiotensin II (0,1 µM; 1 µM; 10 µM), mit Valsartan (0,01 µM; 0,1 µM; 1 µM; 10 µM) bzw. Ramiprilat (0,1 µM; 1 µM; 10 µM; 100 µM). Es wurde mit jeweils 100 µl/well stimuliert.

Beim BrdU-Test erfolgte die Messung erneut zu zwei Zeitpunkten: drei und fünf Tage nach Stimulation. Sieben Stunden vor Stimulationsende wurden jeweils 10 µl "BrdU labeling solution" je Probe hinzugegeben und der BrdU-Einbau im Rahmen der DNA-Synthese abgewartet. Am Ende der Stimulationszeit wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen durch Zugabe von 200 µl/well „FixDenat“ für 30 min fixiert und denaturiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 100 µl/well Blockierungsreagenz für 30 min abgeblockt und danach die Probenüberstände entfernt. Die in „Antibody solution“ gelöste „Anti-BrdU-POD“-Antikörper wurden als Mixtur zu 100 µl/Probe gegeben und die Bindungsreaktion 30 min abgewartet. Es folgten drei Waschvorgänge mit jeweils 200 bis 300 µl/well Waschlösung. Die Substratlösung wurde zu jeder Probe für 30 min hinzugegeben. Durch Zugabe von 25 µl einer 1 molaren Schwefelsäure wurde die Substratumsetzung durch den gelabelten Antikörper gestoppt. Die photometrische Messung erfolgte unverzüglich und über die nächsten 5 min mit einem ELISA-Reader ($\lambda = 450$ nm; Referenzwellenlänge $\lambda = 690$ nm).

3.6 Proteingehaltbestimmung

Um den Proteingehalt einer Zelle zu bestimmen, wurde zunächst die Zellzahl der jeweiligen Probe und anschließend die Gesamtproteinmenge der Probe nach der Methode von Bradford *et al.* bestimmt. Der Quotient von Gesamtprotein und Zellzahl ergab so die durchschnittliche Proteinmenge einer Zelle. Dies diente zur Bestimmung der Zellhyperplasie.

Auf Petrischalen von 10 cm Durchmesser wurden jeweils 1×10^6 Zellen in 10 ml Nährmedium (Medium 1) ausgesät. Je Probe wurden $N = 3$ Bestimmungen durchgeführt. Nach 24 h der Zelladhäsion wurden die Zellen durch Umsetzen in das Minimalmedium (Medium 2) für weitere 24 h synchronisiert. Die Zellen wurden mit den Pharmaka Valsartan (0,01 µM; 0,1 µM; 1 µM; 10 µM) und Ramiprilat (0,1 µM; 1 µM; 10 µM; 100 µM) in aufsteigenden Konzentrationen eine Stunde vor Angiotensin II-Stimulation behandelt. Ang II wurde erneut in Konzentrationen von 0,1 bis 10 µM zugegeben.

Das Medium wurde nach drei Tagen gewechselt. Am Tag der Stimulation, als „Tag Null“ bezeichnet, erfolgte die Proteinbestimmung in einer Kontrolle ($N = 3$). Am „Tag 4“ und am „Tag 7“ wurden erneut Proteinbestimmungen in jeweils drei

korrespondierenden Versuchsansätzen (N = 3) bestimmt. Diese Proben unterschieden sich durch die zur Stimulation eingesetzte Ang II-Konzentration und durch den jeweiligen Zusatz bestimmter Pharmaka-Konzentrationen oder des entsprechenden Vehikels.

Die gewaschenen Zellen wurden wie bereits beschrieben durch Trypsinisierung und mittels Zellschaber für die Proteinbestimmung als Zellsuspension in 15 ml-Röhrchen vorbereitet und bei 1.300 U/min (RT) für 5 min zentrifugiert. Das Zellepellet wurde in 500 µl PBS resuspendiert. Die Zellzahl wurde wie unter 3.2 beschrieben ermittelt.

Die oben beschriebene Zellsuspension wurde erneut bei 1.200 U/min für 5 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Es folgte die Zugabe von 100 µl Lysispuffer folgender Zusammensetzung.

Lysispuffer-Zusammensetzung:

Tris-HCl	pH 7,5; 20 mM
EDTA	1 mM
EGTA	1 mM
"Triton X-100"	1%
Proteasehemmer erst vor dem Versuch zugeben:	
- Leupeptin	25 µg/ml
- PMSF	1 mM
DTT	2 mM

Nach vollständiger Resuspension wurden die Proben für 15 min auf Eis gestellt und anschließend durch Durchmischen mit einer Tuberkulinspritze aufgeschlossen. Dieses Zelllysate (100 µl) wurde bei 13.000 U/min für 4 min zentrifugiert. Zur photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration aus dem gewonnenen Zelllysate wurden nach der Methode von Bradford *et al.* Standardlösungen mit bekannten Proteinkonzentrationen hergestellt. Hierzu wurde ein „Bio-RAD Protein Assay“ benutzt. Als Stocklösung wurde 1 mg/ml BSA verwendet, das einer Standardreihe (2-20 µg/ml) entsprechend mit Wasser verdünnt wurde. Zu vier Teilen der erhaltenen Proteineichlösung wurde ein Teil eines Farbstoffkonzentrats zugegeben, analog wurden die Proteinlysate mit dem Farbstoffkonzentrat vermengt. Diese wurden parallel zu den Eichlösungen auf eine 96-well Platte gemessen. Die Gesamtproteinkonzentration wurde bei 600 nm mit dem ELISA-Reader gemessen. Anhand der Standardproteinverdünnung (2-20 µg/ml) konnte eine Standardkurve (Abbildung 8) erstellt werden, mit deren Hilfe die optische Dichte der Zelllysate in µg Protein/ml umgerechnet werden konnte. Anhand der

Standardproteinverdünnung konnte eine Standardkurve erstellt werden und daraus konnte die optische Dichte der Proben in μg Protein/ml umgerechnet werden.

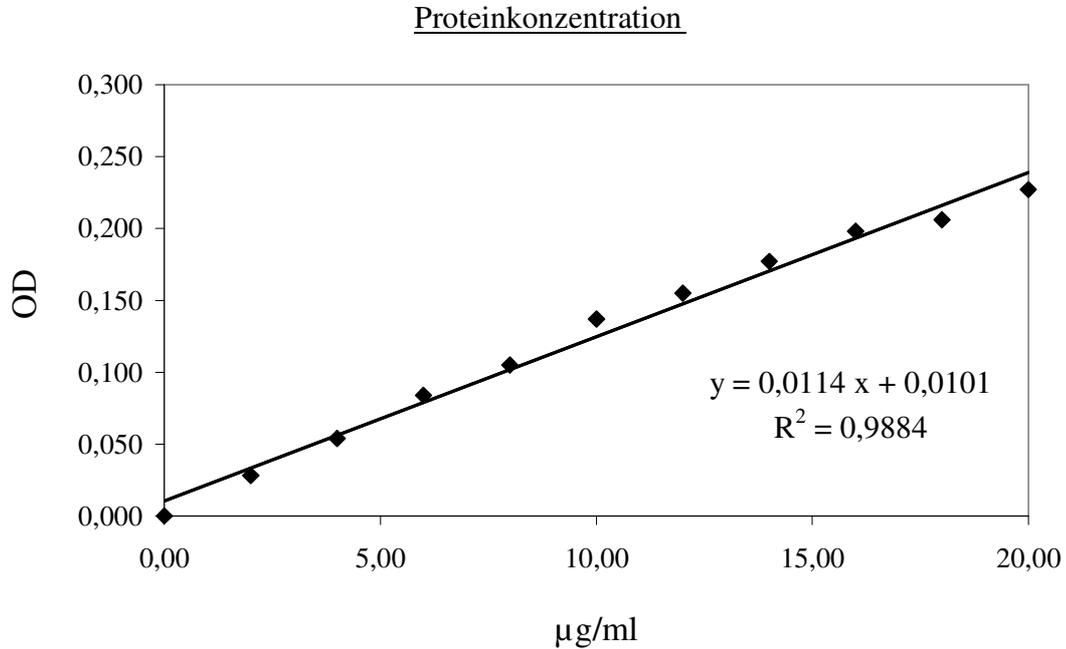


Abbildung 8: Darstellung der Standardkurve zur Proteingehaltbestimmung.

Zur Verdeutlichung der Vorgehensweise bei der Proteingehaltbestimmung soll der Vorgang hier exemplarisch an einem Beispiel verdeutlicht werden. Bei einer Probe aus drei Versuchsansätzen wurde die optische Dichte von 0,164 gemessen. Anhand der bereits ermittelten Standardgeraden ($y = 0,0114x + 0,0101$) wurde nun als y-Wert die gemessene Probe eingesetzt und die Gleichung nach x aufgelöst:

$$x = \frac{0,164 - 0,0101}{0,0114} = 13,5 \mu\text{g/ml}$$

Anschließend wurde mit 100 multipliziert, da 5 μl des Lysats auf 500 μl verdünnt (Faktor 1:100) wurden:

$$13,5 \mu\text{g/ml} * 100 = 1350 \mu\text{g/ml}$$

Um den Gesamtproteingehalt der Probe aus 0,1 ml Lysat zu berechnen, wurde nun mit 0,1 ml multipliziert:

$$1350 \mu\text{g/ml} * 0,1 \text{ ml} = 135 \mu\text{g}$$

Dividiert man die dazugehörige Zellzahl durch den Proteingehalt, so erhielt man den durchschnittlichen Proteingehalt pro Zelle:

$$\frac{135 \mu\text{g}}{1.330.000 \text{ Zellen}} = 0,1 \text{ ng Protein/Zelle}$$

3.7 Laktatdehydrogenase (LDH)-Toxizitätstest

Der Laktatdehydrogenase-Test ist ein photometrisch-kolorimetrischer Test. Das Verfahren basiert auf der Messung der Aktivität des Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH), welches im Rahmen der Zell-Lyse von abgestorbenen Zellen aus dem Cytosol freigesetzt wird. Die Laktatdehydrogenase oxidiert Laktat, indem NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ reduziert wird. Im Test werden diese zwei Wasserstoff-Ionen von einer Catalyst-Lösung auf ein Tetrazoliumsalz (gelbe Farbe) übertragen, so dass dieses zu einem Formazansalz (rote Farbe) reduziert wird. Der Farbumschlag ist somit proportional zur Menge an LDH im Überstand der Zellen und wird photometrisch bestimmt.

Zum LDH-Test wurden folgende Materialien benötigt:

Cytotoxicity Detection Kit (LDH):

Reaktionmischung bestehend aus (für eine Multi-Titer-Platte):	
"Catalyst Lösung"	250 μl
"INT dye solution"	11,25 ml
"Triton X-100"	1 % verdünnt in Medium 2

Nach Zellzahloptimierung erfolgte die Aussaat von 1×10^3 Zellen in jeweils 100 μl Nährmedium (Medium 1) auf eine 96-well-Multititerplatte (MTP). Es folgte die Zelladhäsion für 24 h und Synchronisation der Zellen (Medium 2; siehe 3.3) für weitere 24 h. Anschließend wurden die Zellen mit Ang II stimuliert und die jeweiligen Konzentrationen der Pharmaka oder ihre Vehikel zupipettiert. Als Kontrollen wurden ein

„Leerwert“ mit Medium, eine „minimale Toxizität“ mit unstimulierten Zellen sowie eine „maximale Toxizität“ unter Zugabe des Membrandestabilisators „Triton X-100“ als 1 %-Lösung erstellt und mitgeführt.

Drei Tage nach erfolgter Zellstimulation wurden die MTP für 10 min bei 1.200 U/min zentrifugiert. 100 µl des Überstandes wurden auf eine neue MTP übertragen. Von der frisch angesetzten Reaktionsmischung bestehend aus „Catalyst Lösung“ und „INT dye solution“ wurden 100 µl pro Probe zum Überstand pipettiert. Anschließend wurden die Platten für 30 min unter Lichtausschluss inkubiert. Die Messung erfolgte mit dem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von $\lambda = 490$ nm (Referenzwellenlänge $\lambda = 690$ nm).

3.8 RT-PCR

Eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte und kann so zur Detektion interessierender DNA-Transkripte verwendet werden. Im Rahmen der PCR wird die DNA durch Temperaturerhöhung auf 95 °C (Denaturierungsphase) in ihre zwei komplementären Stränge getrennt. Anschließend wird die Temperatur auf die primerspezifische Annealingtemperatur gesenkt, so dass es zur Hybridisierung der spezifischen Oligonukleotide an dem zu amplifizierenden DNA-Strang kommt (Annealing Phase). Zum Schluss wird durch Temperaturerhöhung auf 72 °C das Temperaturoptimum für die Taq-DNA-Polymerase erreicht, so dass an die Oligonukleotide mittels DNA-Synthese der spezifische DNA-Strang gebildet werden kann (Elongationsphase).

Bei der Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) wird zuerst aus RNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase eine komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert, die dann wie oben beschrieben zur eigentlichen PCR eingesetzt wird. Die RT-PCR kann so als Methode genutzt werden, um mRNA-Konzentrationen in Zellen semiquantitativ zu erfassen und so Aussagen über Änderungen spezifischer Faktoren in der Zelle auf Translationsebene zu treffen.

Es wurden 1×10^5 Zellen je well auf 6-well-Platten ausgesät. Nach Aussaat der Zellen und 24 h Zelladhärenz mit anschließender 24 stündiger Zellsynchronisation wurden die Zellen stimuliert und für 90 min im Brutschrank inkubiert. Für die Stimulation wurde

Ang II in ansteigenden Konzentrationen (0,1 μ M; 1 μ M; 10 μ M) zugegeben und die jeweiligen Konzentrationen der Pharmaka oder ihre Vehikel zupipettiert.

Für die RNA-Isolierung wurden folgende Materialien benötigt:

RNA-Isolierung:

RNeasy Mini Kit beinhaltet für eine Probe:

"RLT-Puffer"	300 μ l je well; mit 1 % β -Mercaptoethanol
"RW1-Puffer"	700 μ l
"RPE-Puffer"	2 x 500 μ l
"RNase-Freies-Wasser"	30 μ l
"QIAshredder Säule"	
"RNeasy mini spin Säule"	
β -Mercaptoethanol	(siehe RLT-Puffer)
Ethanol	2 x 600 μ l; 70 %
PBS-Dulbecco	2 ml/well

Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Die Zellen wurden mit 2 ml PBS gewaschen und mit 600 μ l RLT-Puffer mit β -Mercaptoethanol-Lösung lysiert, mit einem Schaber abgelöst und das Lysat zum Homogenisieren auf eine „QIAshredder Säule“ gegeben. Die Säule wurde für 2 min bei Raumtemperatur (RT) und 13.000 U/min zentrifugiert. Zu dem homogenisierten Lysat wurden 600 μ l 70 % Ethanol gegeben und die Probe auf die „RNeasy mini spin“ Säulen übertragen. Es folgte eine Zentrifugation (15 s, 10.000 U/min, RT). Das Filtrat wurde verworfen und 700 μ l Puffer RW1 wurden auf die Säule gegeben. Nach 5 Minuten Einwirkzeit wurde die Säule zentrifugiert (15 s, 10.000 U/min, RT), danach auf ein neues Sammelröhrchen umgesetzt und 2x mit 500 μ l „RPE-Puffer“ gewaschen (15 s, 10.000 U/min, RT; 2 min, 13.000 U/min, RT). Abschließend wurde die RNA mit 30 μ l „RNase-freiem-Wasser“ in einem RNase freien Reaktionsgefäß eluiert. (1 min, 10.000 U/min, RT). 2 μ l der Probe wurden für die photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA benötigt und der Rest bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung wurden 2 μ l RNA mit 498 μ l Wasser verdünnt und photometrisch ($\lambda = 260$ nm/ 280 nm) bestimmt. Die Ratio befand sich stets zwischen 1,5 und 2,0. Dies diente zur Feststellung der Reinheit der RNA. Die optische Dichte der Proben wurde mit dem Verdünnungsfaktor und dem Extinktionskoeffizienten für RNA 0,04 mg/ml multipliziert, um die RNA Menge in mg pro ml zu ermitteln. Anschließend wurde errechnet, wieviel μ l der Probe gebraucht wird um 1 μ g RNA zu erhalten. Dieses Volumen wurde für die RT-PCR eingesetzt.

Für die RT-Reaktion wurden folgende Materialien verwendet:

Materialien für die RT-Reaktion:

<u>Je Probe:</u>	
"5xFirst Strand Buffer"	4 µl
dNTP's	0,4 µl; (25 mM)
DTT	0,6 µl; (0,4 M)
"Random-Primer"	1 µl
BSA	0,7 µl; (3mg/ml)
"RNasin Ribonuklease Inhibitor"	0,5 µl; (40 U/µl)
"DNase"	1 µl; (10 U/µl)
RNA	1 µg
DEPC Wasser	ad 19 µl

nach dem DNA-Verdau- und Denaturierungsprogramm:

21 °C ==> 1 min
 37 °C ==> 30 min
 90 °C ==> 5 min

erfolgte die Zugabe von:

Reverse Transkriptase 1 µl; (200 U/µl)

anschließend das Programm der RT-Reaktion:

25 °C ==> 10 min
 42 °C ==> 50 min
 95 °C ==> 5 min
 4 °C ==> Pause

Durch das Verdau- und Denaturierungsprogramm werden mögliche Verunreinigungen durch eigene Zell-DNA beseitigt, dies geschieht durch Aktivierung der DNase bei 37 °C. Eine Erhöhung der Temperatur auf 90 °C zerstört die DNase nach erfüllter Funktion. Anschließend erfolgt die Zugabe der Reversen Transkriptase und die eigentliche RT-Reaktion beginnt mit 25 °C. Hierbei handelt es sich um die Annealing-Phase, bei der Random-Primer an die RNA an lagern. Durch die Reverse Transkriptase (optimale Temperatur bei 42 °C) kommt es durch Anlagerung von Nukleotiden zur Bildung von cDNA an der mRNA. Eine Denaturierung der Reversen Transkriptase findet bei den folgenden 95 °C statt. Die Probe wurde auf Eis gestellt, mit 80 µl Wasser verdünnt und die cDNA bei -20°C gelagert.

Für die semiquantitative PCR wurden folgende Materialien verwendet:

Materialien für die PCR:Je Probe (50 µl):

cDNA	5 µl
10xPuffer	5 µl
dNTP's	5 µl; je 2,5 nM
0,4 µl GAPDH-Primer 1	0,4 µl; 10 pmol/µl
0,4 µl GAPDH-Primer 2	0,4 µl; 10 pmol/µl
Egr-1-Primer 1	2,5 µl; 10 pmol/µl
Egr-1-Primer 2	2,5 µl; 10 pmol/µl
Taq "HotStar"	0,5 µl; 0,5 µl
Aqua dest.	28,7 µl

Je Gel wurden verwendet:

Agarose	2%
TAE-Puffer mit Ethidiumbromid	0,5 µg/ml

Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide lauten:

Oligonukleotidsequenzen:

GAPDH-Primer 1:	5' – GGA TGA CCT TGC CCA CAG CC – 3'
GAPDH-Primer 2:	5' – GCT GGG GCT CAC CTG AAG GG – 3'
Egr-1-Primer 1:	5' – CTT CAG TCG TAG TGA CCA CCT TAC C – 3'
Egr-1-Primer 2:	5' – CAT GTC TGA AAG ACC AGT TGA GGT GC – 3'

Das PCR-Programm beinhaltet folgende Schritte:

PCR-Programm:

	95°C – 15 min
[32x	94°C – 1 min
	58°C – 1 min
	72°C – 1 min
	72°C – 10 min
	4°C – Pause

Bei einer Anfangstemperatur von 95 °C kommt es bei einer PCR zur Denaturierung der cDNA. Außerdem wird die Taq-Polymerase „HotStar“ durch Lösen der Polymerase von seinem kovalent-gebundenen Protein aktiviert. Ebenso dient die ein-minütige Erhöhung auf 94 °C der folgenden Zyklen zur Denaturierung der gebildeten doppelsträngigen DNA.

Die optimale Annealing Temperatur für Oligonukleotide des Egr-1 wurde bestimmt durch Abzug von 5 °C von der mittleren Schmelztemperatur (die mittlere Schmelztemperatur für kleine Primer mit ca. 20 Basen wird berechnet: $4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$). Die Elongation erfolgt bei 72 °C, als Temperaturoptimum für die Taq-Polymerase. Die weiteren 10 min bei 72 °C am Ende der PCR dienen dazu, sämtliche angebrochenen DNA-Fragmente zu vervollständigen. Anschließend wurde ein 2 % Agarose Gel in TAE-Puffer und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid gegossen. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit der entsprechenden Menge „10xDNA-Proben-Puffer“ versetzt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in TAE-Puffer. Die Gelelektrophorese fand in einer horizontalen Elektrophoresekammer (9 x 10 cm) bei 80 mA für 2,5 h statt. Die Gele wurden unter UV-Licht mit einer „charge couple device“ (CCD)-Kamera (Herolab UVT-28M) fotografiert und mit dem „Tina Version 2.09g“-Programm densitometrisch ausgewertet. Die Stärke der Bande für Egr-1 wurde auf die entsprechende GAPDH-Bande bezogen und diese Ratio statistisch ausgewertet.

3.9 Lichtmikroskopische Begutachtung der Zellen, Fotodokumentation

Die Mesangiumzellen wurden einerseits nativ fotografiert und andererseits luftgetrocknet und mit Hämatoxylin gefärbt.

Es wurde eine Zellzahl von 1×10^5 /Kammer in „Chambers sligths“ ausgesät und wie unter 3.4 beschrieben behandelt.

Fotografiert wurde am Tag 4 und 7 nach der Stimulation. Die Zellen wurden mit 500 µl PBS gewaschen und die Zellen im nativen Zustand fotografiert. Nach dem Fotografieren wurden die Zellen auf den Objektträgern luftgetrocknet und für 5 min in ein Hämatoxylinbad gelegt. Danach wurden sie für eine halbe Stunde im Wasser gebläut. Das Trocknen erfolgte über Nacht. Die Zellen zeigten die typische sternförmige Morphologie der Mesangiumzellen. Mittels der Hämatoxylinfärbung konnte das durchsichtige Zytoplasma mit Kern mit einem Phasenkontrastmikroskop (Olympus BX50) mit der 100 x Vergrößerung beurteilt werden. Die Zellen wurden hinsichtlich ihrer Morphologie und ihrer Größe (insbesondere der Kernplasmarelation) verglichen.

3.10 Statistik

Die Ergebnisse der Proteinbestimmung wurden mit der Varianzanalyse (ANOVA) ausgewertet. Im Vordergrund stand die Frage, ob es signifikante Unterschiede im Hinblick auf den Proteingehalt der Zelle gibt: a.) in Bezug auf verschiedene Angiotensin II-Konzentrationen untereinander und zur Kontrolle; b.) in Bezug auf die Abhängigkeit vom Zeitverlauf (zwei Zeitpunkte: 4 Tage, 7 Tage); c.) in Bezug auf die Auswirkung der beiden Medikamente Valsartan und Ramiprilat auf die mit Angiotensin II-behandelten Zellen.

Als Anschluss-tests wurden DUNNETT (Frage nach einem signifikanten Unterschied beim Vergleich von Kontrolle zu den mit Angiotensin II alleine und mit den zwei Medikamenten Valsartan und Ramiprilat behandelten Proben) und BONFERONI-HOLM (Frage nach einem signifikanten Unterschied beim Vergleich von den Angiotensin II Konzentrationen untereinander, bei zusätzlicher Behandlung mit den Medikamenten Valsartan und Ramiprilat und im Hinblick auf die Auswirkung im Zeitverlauf) verwendet. Die Fehlerwahrscheinlichkeit α (Fehler erster Ordnung) liegt unter 5 % ($p < 0,05$), sofern nicht anders angegeben.

Die Auswertung des MTT-, BrdU- und LDH-Tests erfolgte mit dem Student t-Test (einfache ANOVA). Hier wurde der Mittelwert jeweils aus sechs Messwerten plus Standardabweichung gebildet und 2-seitig für unverbundene Stichproben miteinander verglichen. Ebenso erfolgte die Auswertung der Egr-1-Expression. Hier wurde der Mittelwert aus drei Messwerten der densitometrischen Analyse gebildet.

4 Ergebnisse

4.1 Testung einer optimalen Mediumzusammensetzung:

Zur optimalen Zusammensetzung an Inhaltsstoffen im Medium im Hinblick auf eine Ang II-Stimulation (0,1 μM ; 1 μM ; 10 μM) wurden unterschiedliche Konzentrationen an Glukose (1,0 g/l), Insulin (0,01 μM ; 0,1 μM ; 1 μM) und FCS (2,5 %; 5 %) in Kombination im MTT-Test nach 2 Tagen Stimulation getestet. Dies soll hier exemplarisch für eine 1 μM Ang II-Stimulation gezeigt werden (Tabelle 1).

Tabelle 1: Dargestellt sind die Ergebnisse im MTT-Test bei einer Kombination von unterschiedlichen Mediumzusätzen zur Testung eines optimalen Mediums für eine Ang II-Stimulation nach 2 Tagen (1 μM) an Mesangiumzellen

Stimulation mit 1 μM Ang II			
Glukose	FCS	Insulin	Prozent Vitalität im Vergleich zu 100 % Kontrolle
1 g/l	2,5%	0 μM	90%
		0,01 μM	68%
		0,1 μM	83%
		1 μM	73%
	5%	0 μM	95%
		0,01 μM	61%
		0,1 μM	60%
		1 μM	89%
4,5 g/l	2,5%	0 μM	104%
		0,01 μM	65%
		0,1 μM	61%
		1 μM	91%
	5%	0 μM	121%
		0,01 μM	71%
		0,1 μM	68%
		1 μM	97%

Dabei zeigte sich eine tendenzielle, aber nicht signifikant bessere Antwort auf eine Stimulation mit Ang II bei einem Zusatz von 4,5 g/l Glukose als im Vergleich mit 1 g/l Glukose. Sowohl die Ergebnisse dieser Arbeit, als auch Hinweise in der Literatur zeigten, dass eine Kombination von Ang II und Insulin eine Hemmung im Wachstumsverhalten an Zellen bewirkt. Aus diesem Grunde wurde absichtlich auf die Zugabe von Insulin

verzichtet. Ebenso wurde versucht den Gehalt an FCS zu minimieren, da dieses auch Insulin (und weitere Wachstumsfaktoren) beinhaltet. In folgenden Untersuchungen wurde im MTT- und BrdU-Test und in der Zellzählung gezeigt, dass unter einem minimalem Gehalt von 0,25 % FCS Mesangiumzellen über eine Zeitdauer von 7 Tagen (Mediumwechsel jeden 3. Tag) ihre Zellvitalität nicht einbüßen. Aus diesen Gründen wurde für die Zielsetzung dieser Arbeit ein Medium mit Zusatz von 4,5 g/l Glukose und 0,25 % FCS, ohne Insulin gewählt.

4.2 Toxizität der verwendeten Substanzen

Sowohl das Ang II mit und ohne Vehikel, als auch der ACE-Hemmer Ramiprilat und der AT1-Rezeptor-Antagonist Valsartan zeigten keine toxische Wirkung. An zwei Abbildungen soll die Toxizität des Ang II (10 μM) mit Vehikel und unter Zusatz von Ramiprilat einerseits (Abbildung 9) und Valsartan andererseits (Abbildung 10) in aufsteigenden Konzentrationen gezeigt werden:

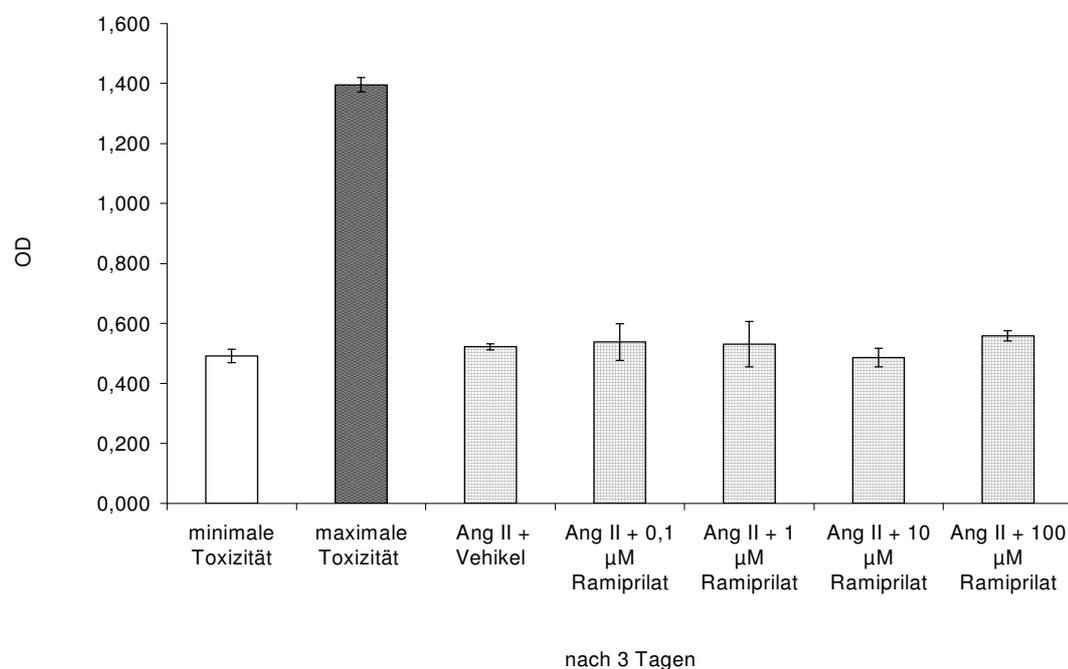


Abbildung 9: Dargestellt ist die Toxizität des Ang II (10 μM) plus Vehikel (kariert) und die Toxizität des ACE-Hemmers Ramiprilat (kariert; 0,1 μM ; 1 μM ; 10 μM ; 100 μM) im Vergleich zur „minimalen Toxizität“ (weiß) und „maximalen Toxizität“ (dunkel gewellt) am Tag 3 nach Stimulation; N = 6 \pm SD

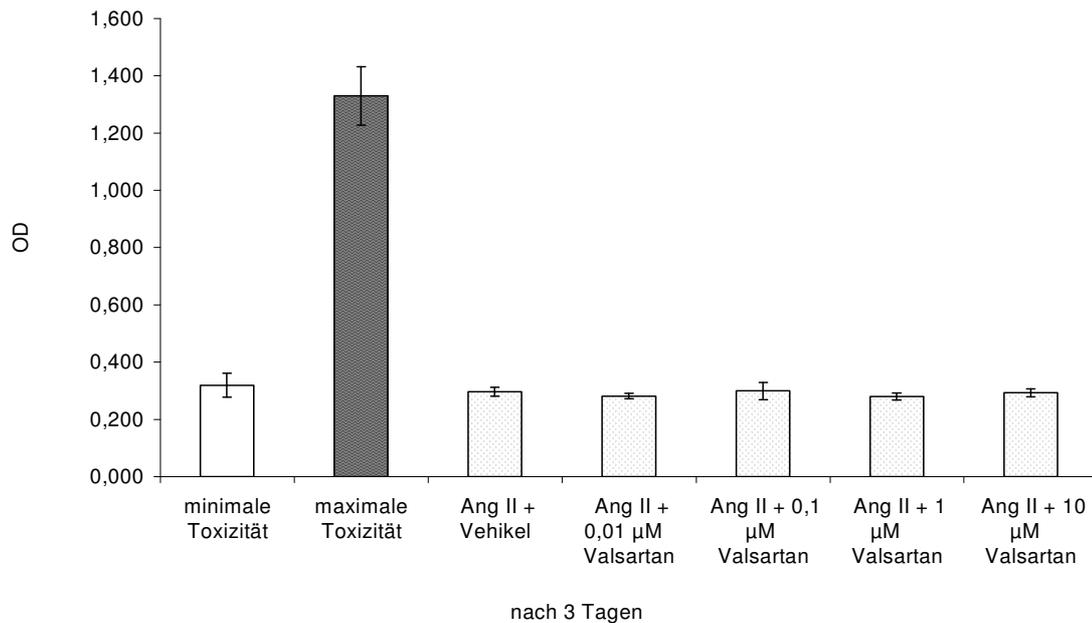


Abbildung 10: Dargestellt ist die Toxizität von Ang II (10 µM) plus Vehikel (gepunktet) und die Toxizität von Ang II (10 µM) mit Zusatz von Valsartan (gepunktet; 0,01 µM; 0,1 µM; 1 µM; 10 µM) im Vergleich zur „minimalen Toxizität“ (weiß) und „maximalen Toxizität“ (dunkel gewellt); N = 6±SD

Alle untersuchten Konzentrationen des Ang II (0,1 µM; 1 µM; 10 µM) zeigten sowohl mit als auch ohne Vehikelzusatz keine signifikante Toxizität (Ergebnisse nur für die höchste Konzentration (10 µM) aufgezeigt) im Vergleich zur „minimalen Toxizität“. Ebenso wiesen beide untersuchten Pharmaka im LDH-Toxizitätstest keine signifikante Toxizitätszunahme auf.

4.3 Zellproliferation (MTT- und BrdU-Test)

Der MTT-Test zeigte unter Ang II-Stimulation kein einheitliches Proliferationsverhalten an den untersuchten Mesangiumzellen in den Konzentrationen 0,1 µM, 1 µM und 10 µM. Auch die Versuche, eine Proliferation über eine längere Einwirkdauer des Angiotensin II (3 und 5 Tage) an den Mesangiumzellen zu erzielen, zeigten keine signifikant stetige Proliferationsrate. Vielmehr wurde deutlich, dass die Werte unter Angiotensin II-Einfluss im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle bis zu 15 % sowohl nach oben als auch nach unten streuten. Es konnte daher im MTT-Test auch keine gezielte Testung der Wirkung des ACE-Hemmers Ramiprilat oder des AT1-Antagonisten Valsartan

durchgeführt werden. Tendenziell war aber eine geringe Proliferation durch Valsartan in jedem Fall hemmbar, wohingegen die Zugabe des ACE-Hemmers Ramiprilat in keinem der Versuchsansätze eine proliferationshemmende Wirkung zeigte.

Im BrdU-Test wurde eine geringe, aber signifikante BrdU-Einbau-Erhözung unter Angiotensin II-Einfluss beobachtet, besonders in den Konzentrationen 0,1 μM und 1 μM am Tag 5 (Abbildung 11).

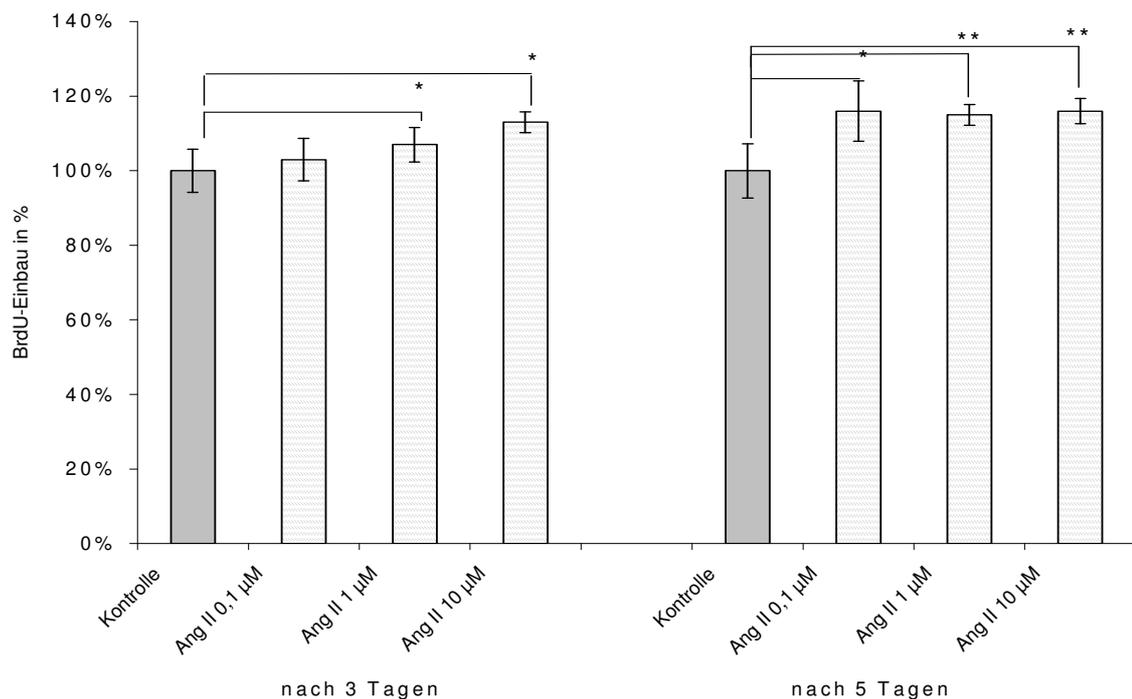


Abbildung 11: Dargestellt ist die Wirkung von Ang II in aufsteigenden Konzentrationen (0,1 μM ; 1 μM ; 10 μM) auf die DNA Synthese anhand des BrdU 3 und 5 Tage nach Stimulation; N = 6 \pm SD; *p<0,05; **p<0,01; Student t-Test

Ang II führte in den Konzentrationen 1 μM und 10 μM zu einem signifikant erhöhten Einbau am Tag 3 und 5 nach Stimulation, am Tag 5 nach Stimulation erwies sich auch die 0,1 μM Ang II-Konzentration als signifikant.

4.4 Wirkung eines AT1-Rezeptorantagonisten und eines ACE-Hemmers auf die Zellproliferation

Der ACE-Hemmer Ramiprilat zeigte keine signifikante Wirkung auf das Angiotensin II (Ergebnisse werden nicht aufgezeigt), während der AT1-Rezeptor-Antagonist Valsartan bei einer Konzentration 10 μM am Tag drei und fünf des Versuchs eine Abschwächung der Angiotensin II-Wirkung in den Konzentrationen 0,1 μM und 1 μM aufwies.

Die unten dargestellte Abbildung 12 und Abbildung 13 zeigt exemplarisch die 0,1 μM und 1 μM Angiotensin II-Wirkung auf die Mesangiumzellen mit jeweiliger Behandlung von Valsartan in den Konzentrationen 0,01 μM ; 0,1 μM ; 1 μM und 10 μM am Tag 3 und 5 nach Stimulation:

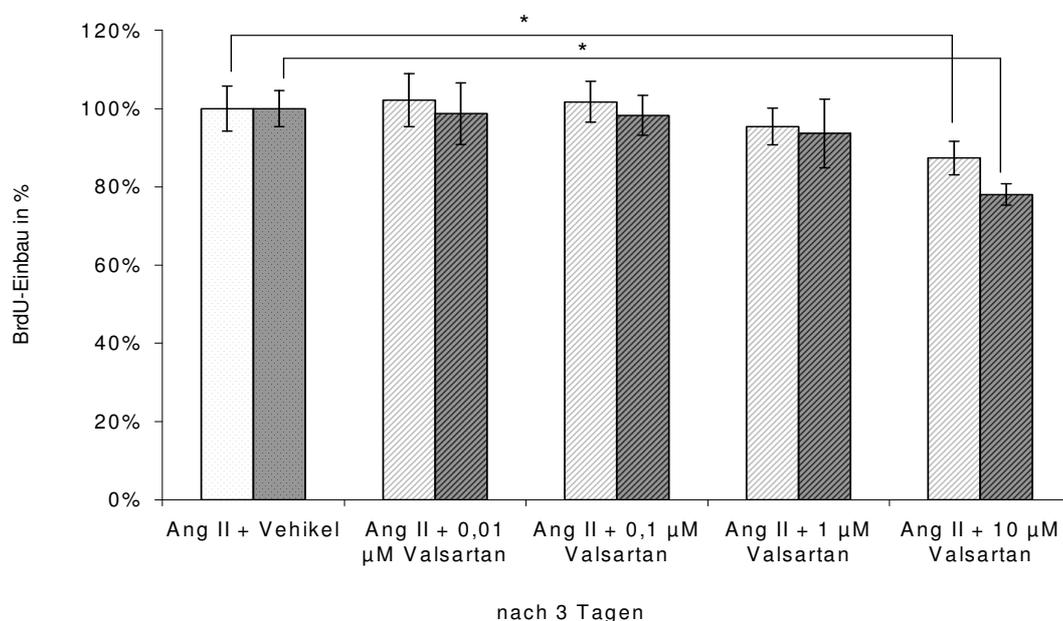


Abbildung 12: Einfluss des AT1-Antagonisten Valsartan (gestrichelt; 0,01 μM ; 0,1 μM ; 1 μM ; 10 μM) auf die durch Ang II (0,1 μM = helle Säulen; 1 μM = dunkle Säulen) ausgelöste DNA-Synthese nach 3 Tagen im Vergleich zur vehikelbehandelten (0,1 % Ethanol) Kontrolle (gepunktet); N = 6 \pm SD; *p<0,05; **p<0,01; Student t-Test

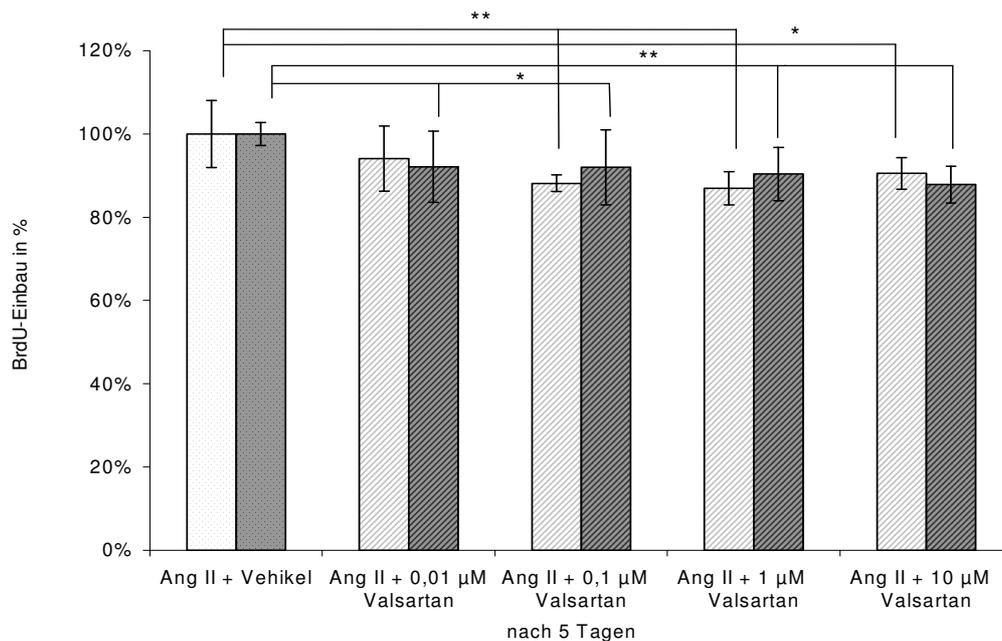


Abbildung 13: Einfluss des AT1-Antagonisten Valsartan (gestrichelt; 0,01 μM ; 0,1 μM ; 1 μM ; 10 μM) auf die durch Ang II (0,1 μM = helle Säulen; 1 μM = dunkle Säulen) ausgelöste DNA Synthese nach 5 Tagen im Vergleich zur vehikelbehandelten (0,1 % Ethanol) Kontrolle (gepunktet); $N = 6 \pm \text{SD}$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Student t-Test

Der ACE-Hemmer Ramiprilat zeigte keine signifikante Wirkung auf das Ang II (Ergebnisse werden nicht aufgezeigt), während der AT1-Rezeptor-Antagonist Valsartan in der Konzentration 10 μM eine signifikante Ang II-Hemmung am Tag 3 und 5 nach Stimulation aufwies. Darüber hinaus zeigte sich auch eine signifikante Hemmung des Ang II in allen anderen Valsartan-Konzentrationen am Tag 5 nach Stimulation.

4.5 Zellhypertrophie (Proteingehaltsbestimmung)

Vier Tage nach Stimulation der Zellen mit Ang II wurde eine signifikante Proteinzunahme pro Zelle beobachtet, während die Zellzahl abnahm (Abbildung 14).

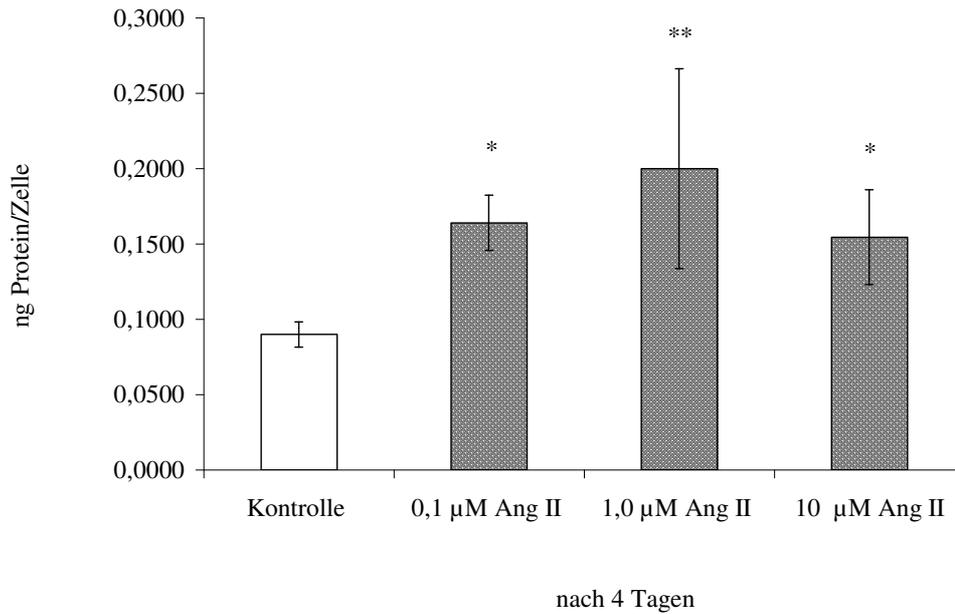


Abbildung 14: Einfluss von Ang II auf den Proteingehalt pro Zelle 4 Tage nach Stimulation; $N = 3 \pm SD$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Statistische Auswertung mit ANOVA, Dunnett

Nach vier Tagen zeigten alle untersuchten Ang II-Konzentrationen eine signifikante Proteingehaltzunahme pro Zelle im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

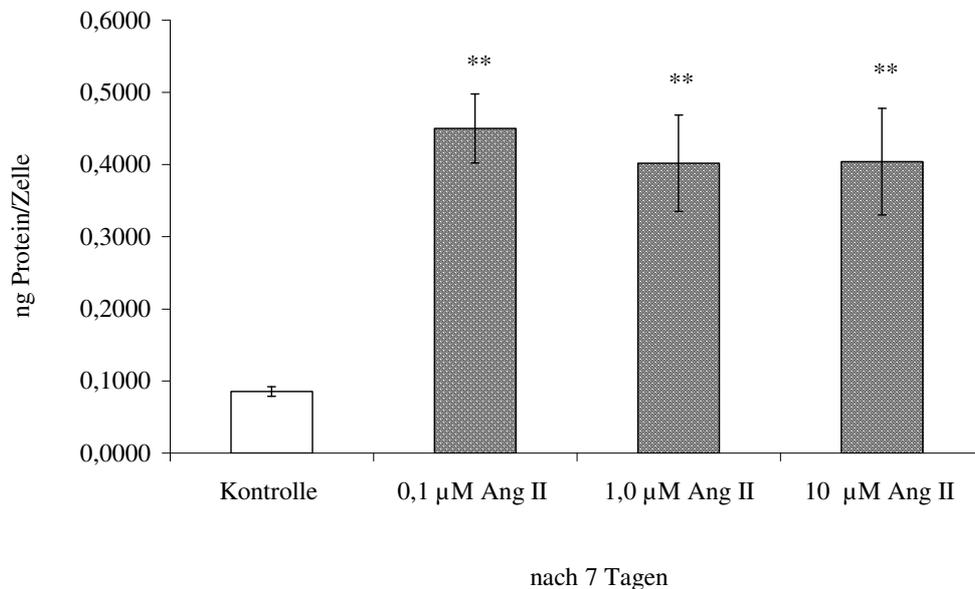


Abbildung 15: Einfluss von Ang II auf den Proteingehalt pro Zelle nach 7 Tagen Stimulation; $N = 3 \pm SD$; ** $p < 0,01$; statistische Auswertung mit ANOVA, Dunnett

Nach 7 Tagen nahm der Proteingehalt der Zelle weiter signifikant zu, im Vergleich zu Tag 4 jetzt um den Faktor 4.

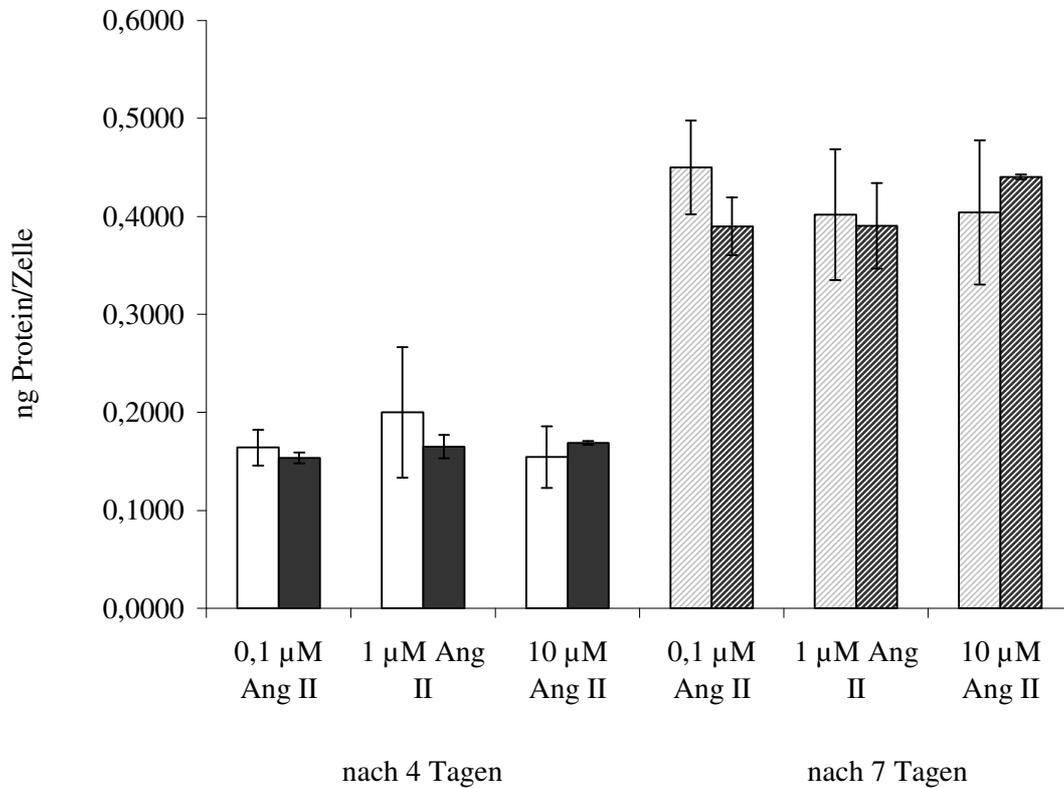


Abbildung 16: Dargestellt ist der Proteingehalt pro Zelle im Vergleich zwischen Ang II ohne (helle Säulen) und mit 0,1 % Ethanol als Vehikel (dunkle Säulen) am Tag 4 (glatt Säulen) und 7 (gestreifte Säulen) nach Stimulation; N = 3±SD; statistische Auswertung mit ANOVA, Dunnett

Es zeigten sich keine signifikanten Differenzen zwischen Proben nur mit Ang II behandelt und Proben behandelt mit Ang II plus 0,1 % Ethanol als Vehikel am Tag 4 und 7 nach Stimulation (Abbildung 16).

4.6 Wirkung eines AT1-Rezeptorantagonisten und eines ACE-Hemmers auf die Zellhypertrophie

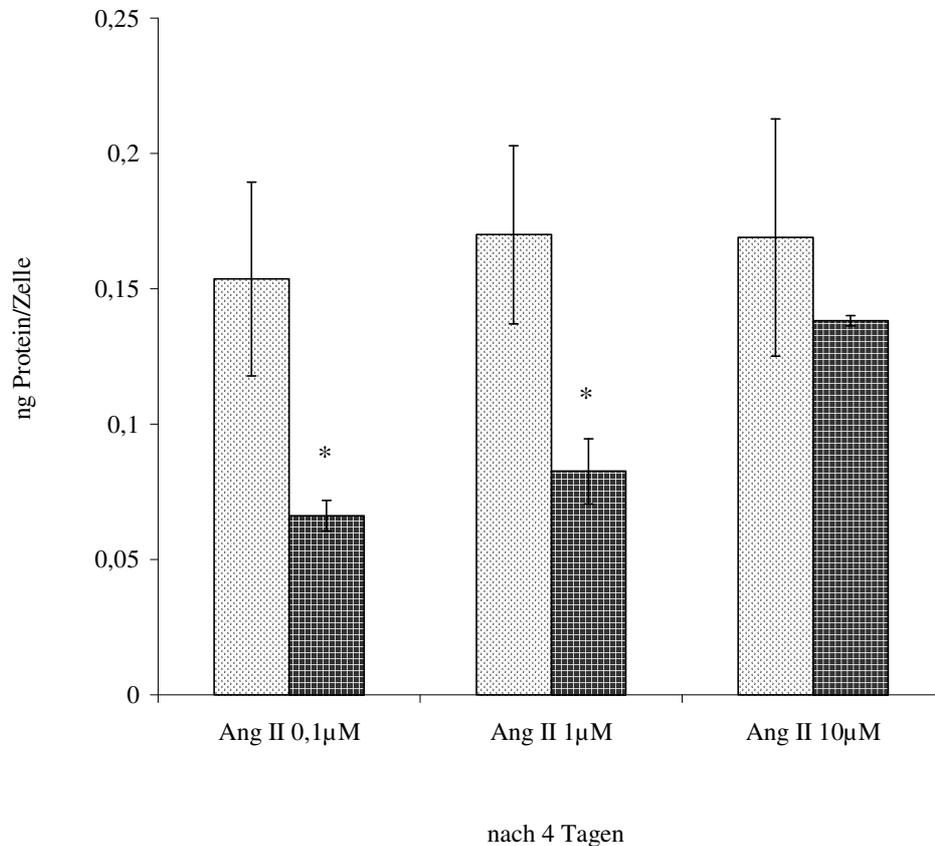


Abbildung 17: Wirkung von 10 μM Valsartan auf den Proteingehalt pro Zelle 4 Tage nachdem die Mesangiumzellen mit ansteigenden Konzentrationen (0,1 μM ; 1 μM ; 10 μM) von Ang II stimuliert worden sind; hell gepunktete Säulen stellen Ang II plus Vehikel (0,1 % Ethanol) dar, dunkel karierte Säulen zeigen Ang II mit Zusatz von Valsartan; $N = 3 \pm \text{SD}$; $*p < 0,05$; statistische Auswertung mit ANOVA, Dunett

Der AT1-Antagonist Valsartan hemmt die durch 0,1 μM und 1 μM Ang II hervorgerufene Zellhypertrophie am Tag 4 nach Stimulation signifikant (Abbildung 17). Zellen, die mit 10 μM Ang II über 4 Tage stimuliert worden sind, wiesen auch nach gleichzeitiger Inkubation mit 10 μM Valsartan nur einen geringen Rückgang der Zellhypertrophie auf. Diese Veränderung war gegenüber stimulierten Zellen, die nicht mit Valsartan kokubiert wurden, nicht signifikant.

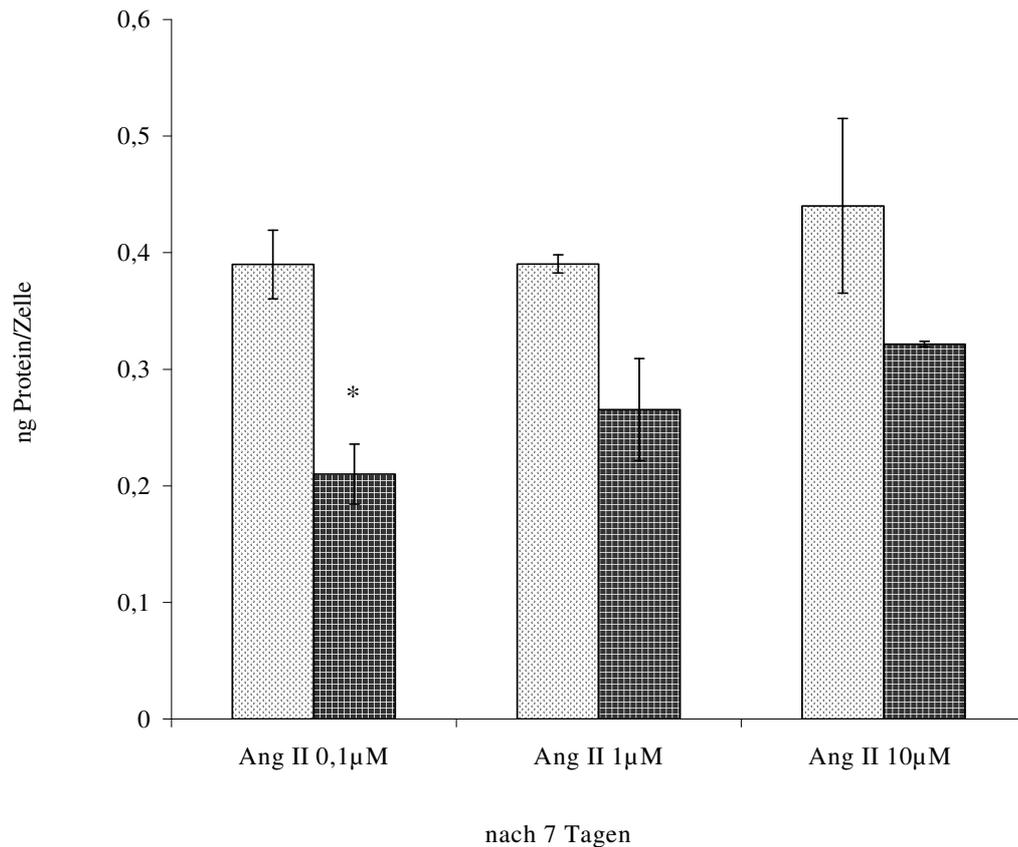


Abbildung 18: Wirkung von 10 μM Valsartan auf den Proteingehalt pro Zelle 7 Tage nachdem die Mesangiumzellen mit ansteigenden Konzentrationen (0,1 μM ; 1 μM ; 10 μM) von Ang II stimuliert worden sind; hell gepunktete Säulen stellen Ang II plus Vehikel (0,1 % Ethanol) dar, dunkel karierte Säulen zeigen Ang II mit Zusatz von Valsartan; $N = 3 \pm \text{SD}$; $*p < 0,05$; statistische Auswertung mit ANOVA, Dunett

Der AT1-Antagonist Valsartan zeigte nur noch eine signifikante Hypertrophiehemmung bei einer 0,1 μM Ang II-Konzentration am Tag 7 nach Stimulation (Abbildung 18).

Der ACE-Hemmer Ramiprilat zeigte keine signifikante Wirkung auf die durch Angiotensin II verursachte Hypertrophie. Die Ergebnisse sind nicht aufgezeigt.

4.7 Expression des „early growth response (Egr-1)-gene“ auf mRNA-Ebene

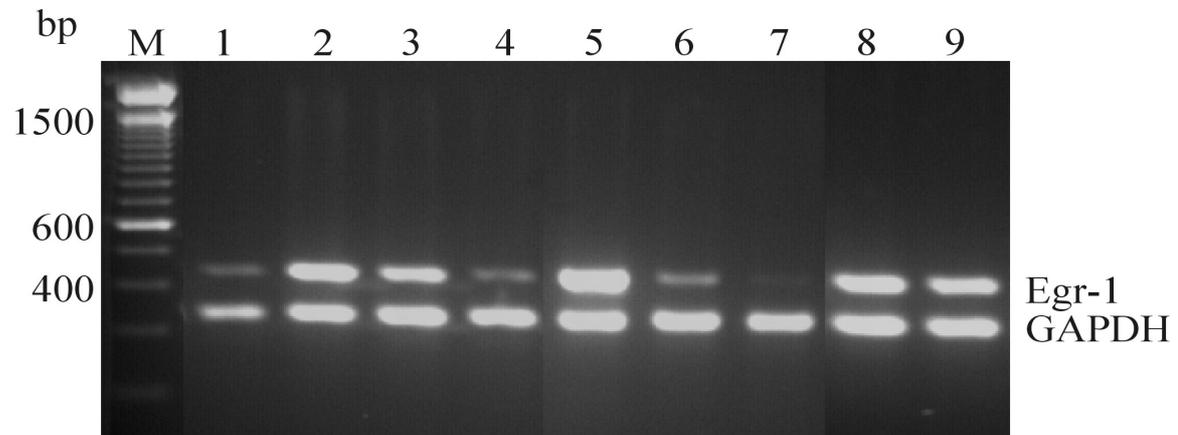


Abbildung 19: mRNA-Spiegel von Egr-1 in Mesangiumzellen unter Stimulation mit Ang II mit und ohne Koinkubation von Valsartan: Spur 1 zeigt die cDNA-Probe einer unbehandelten Kontrolle; Spur 2,3 und 4 zeigen cDNA-Proben nur mit Ang II stimulierten Mesangiumzellen (MZ) (Konzentrationen absteigend: 10 μ M; 1 μ M; 0,1 μ M); Spur 5,6 und 7 stellen die korrespondierenden cDNA-Proben nach Inkubation mit Vehikel (0,1 % Ethanol) dar; Spur 8 und 9 enthält MZ, die mit 10 μ M Ang II stimuliert wurden und mit 10 μ M und 1 μ M Valsartan koinkubiert wurden

Die Banden wurden densitometrisch ausgewertet. Für die Ang II-Stimulation zeigte sich folgende Egr-1-Expression (Abbildung 20).

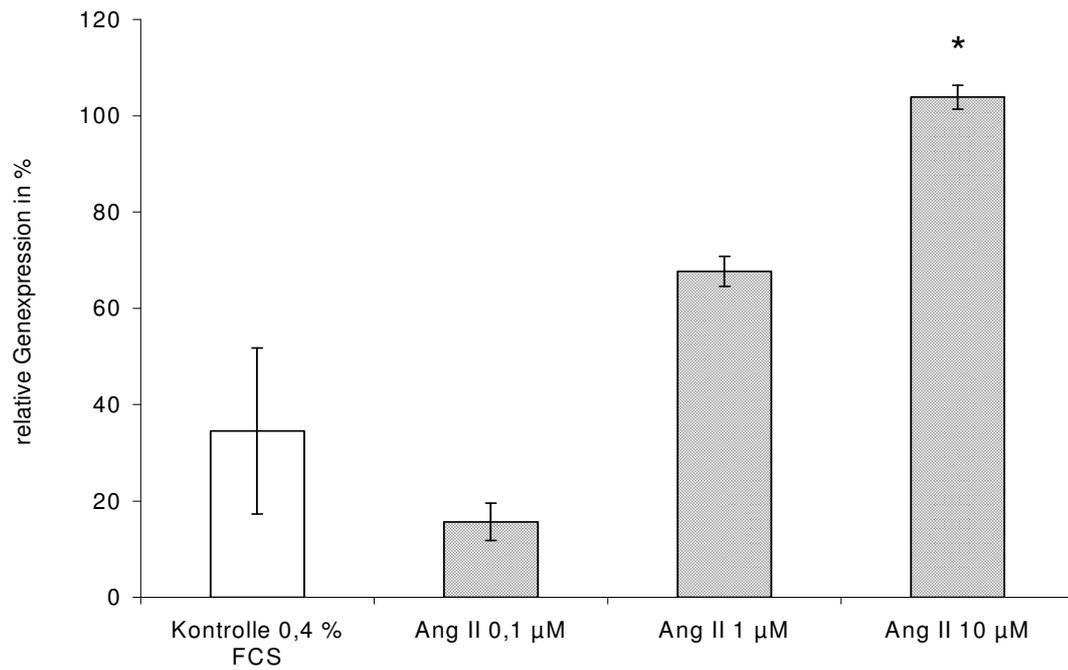


Abbildung 20: Die densitometrische Auswertung der Egr-1-Spiegel 90 min nach Stimulation mit Ang II (ansteigende Konzentrationen von 0,1 µM; 1 µM; 10 µM) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Zusatz von 0,4 % FCS im Medium); die „relative Genexpression“ ist ein Wert, der sich bei der Egr-1-Expression einer Probe in % auf die dazugehörige GAPDH-Bande bezieht; N = 3±SD; *p<0,05; Student t-Test

Die Egr-1-Expression steigt unter Angiotensin II-Konzentrationszunahme. Eine signifikante Egr-1-Expressions-Zunahme in Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zeigte sich bei 10 µM Ang II 90 min nach Stimulation.

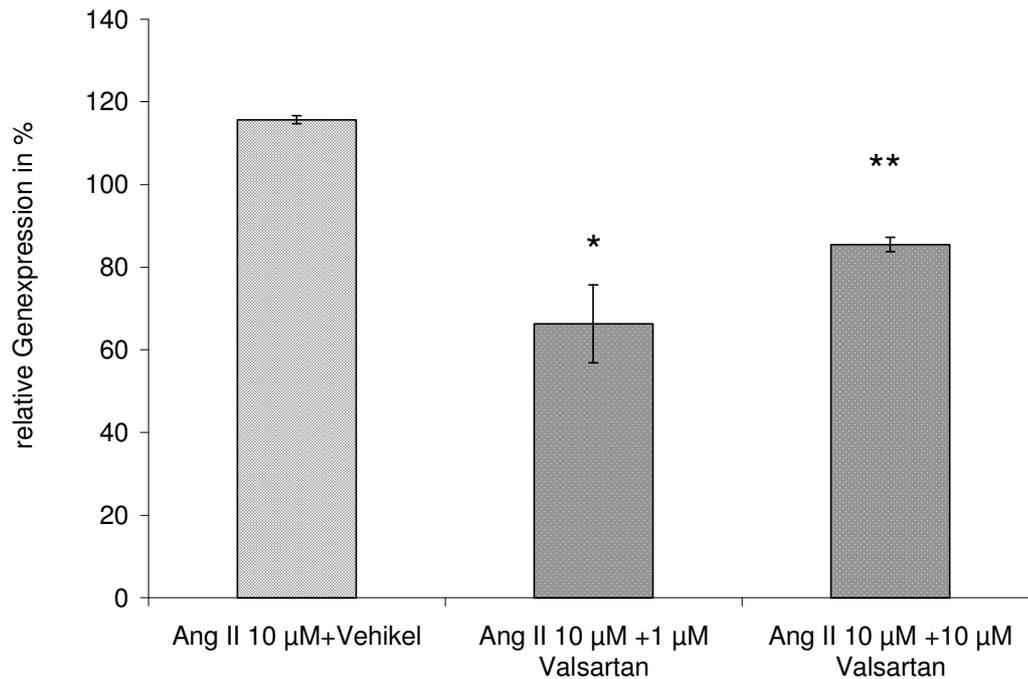


Abbildung 21: Densitometrische Auswertung der Egr-1-mRNA-Spiegel 90 min nach Stimulation mit Ang II (10 µM) plus Vehikel und Koinkubation des Ang II (10 µM) mit dem AT1-Antagonisten Valsartan in den Konzentrationen 1 µM und 10 µM; N = 3±SD; *p<0,5; **p<0,01; Student t-Test

Weiterhin wurde in dieser Arbeit die Wirkung des Valsartans auf die signifikante Egr-1-Expressions-Zunahme untersucht, die durch die 10 µM Ang II-Konzentration ausgelöst wurde (Abbildung 21). Sowohl bei der 1 µM als auch bei der 10 µM Valsartan-Konzentration wurde eine signifikante Egr-1-Expressionshemmung beobachtet.

4.8 Färbung der Zellen mit Hämatoxylin und lichtmikroskopische Begutachtung

Die Fixierung der Zellen mit Hämatoxylin nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,1 µM, 1 µM, 10 µM) von Angiotensin II wurde im Phasenlichtmikroskop hinsichtlich der Zellgröße und Morphologie beurteilt. Eine Zellgrößenzunahme der Zellen insgesamt zeigte sich lichtmikroskopisch bei der Konzentration 0,1 µM Ang II nach einer Stimulationszeit von 7 Tagen. Eine repräsentative Fotografie soll dies demonstrieren (Abbildung 22 und Abbildung 23). Lichtmikroskopisch konnte der hemmende Effekt von Valsartan auf die Zellhypertrophie

nicht nachvollzogen werden. Auch unter Ramiprilat zeigten die Zellen keine wesentlichen Unterschiede zur unstimulierten oder mit Ang II behandelten Kontrolle.

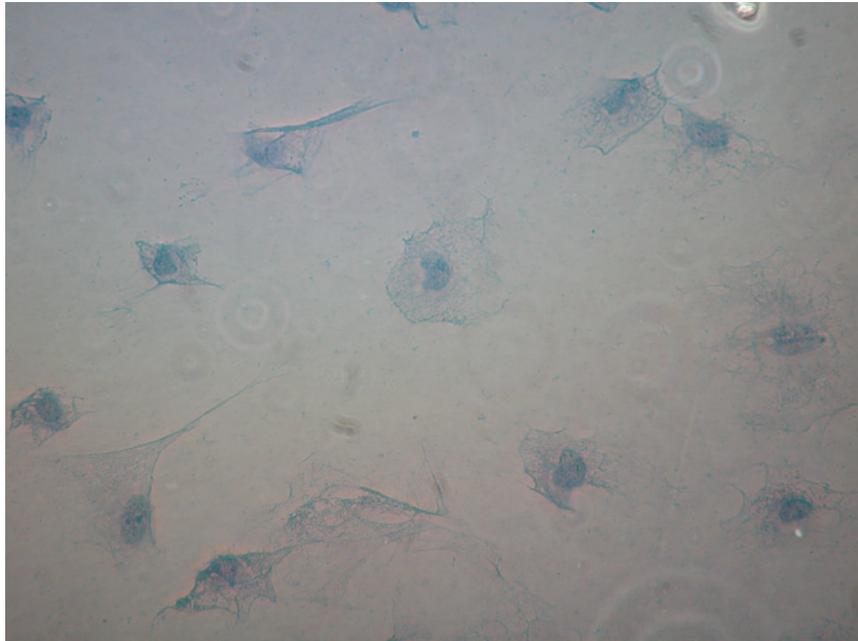


Abbildung 22: Darstellung einer repräsentativen Photographie unbehalteter MZ (Kontrolle) nach 7 Tagen; Hämatoxylin-Färbung; Phasenkontrastmikroskop; 100 x Vergrößerung

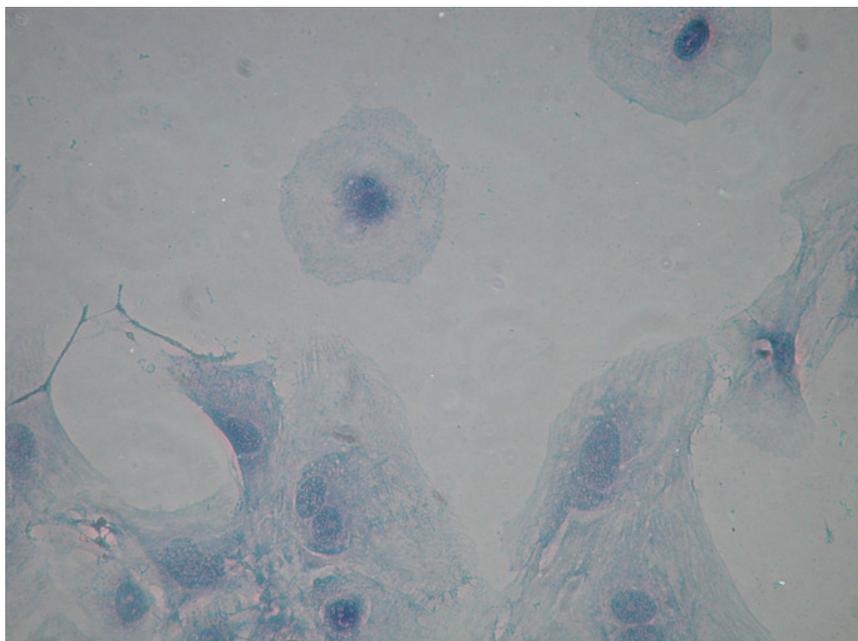


Abbildung 23: Darstellung einer repräsentativen Photographie mit Ang II (0,1 μM) stimulierter MZ nach 7 Tagen; Hämatoxylin-Färbung; Phasenkontrastmikroskop; 100 x Vergrößerung

Anhand der repräsentativen Photographien wird deutlich, dass eine Änderung in der Kernplasmarelation zwischen unbehandelten und mit Ang II (0,1 μ M) stimulierten Zellen zu beobachten ist. Die Größe der Zellkerne ist gleich geblieben, während das Zytoplasma zugenommen hat.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde das Wachstumsverhalten von Mesangiumzellen unter Stimulation mit Ang II (0,1 μ M - 10 μ M) über mehrere Tage (3 bis maximal 7 Tage) untersucht. Als weiterer Schritt wurde der Einfluss des ACE-Hemmers Ramiprilat und des AT1-Antagonisten Valsartan auf das durch Ang II ausgelöste Wachstumsverhalten beobachtet. Sowohl für Ang II (0,1 μ M; 1 μ M; 10 μ M), den ACE-Hemmer Ramiprilat (0,1 μ M; 1 μ M; 10 μ M; 100 μ M) als auch den AT1-Antagonisten Valsartan (0,01 μ M; 0,1 μ M; 1 μ M; 10 μ M) konnte im LDH-Test keine Toxizität nachgewiesen werden. Im MTT-Test als Proliferationstest zeigte sich keine signifikante durch Ang II hervorgerufene Wirkung. Im BrdU-Test konnte eine geringe (15 %), aber signifikante Zunahme der DNA-Synthese am Tag 5 ($N=\pm 6SD$, $p<0,05$) nach Stimulation beobachtet werden. Dieser Effekt konnte durch Zugabe von 10 μ M Valsartan gehemmt werden, während die Zugabe von Ramiprilat keine Wirkung aufwies. Eine deutliche Zunahme der Zellhypertrophie unter Ang II wurde nach einer Stimulationszeit von 4 und 7 Tagen beobachtet. Der Proteingehalt der Zelle verdoppelte sich an Tag 4 und vervierfachte sich an Tag 7 ($N=3\pm SD$, $p<0,01$). Auch hier konnte Valsartan den Ang II-Effekt signifikant hemmen (Blockierung der Ang II Wirkung (0,1 μ M; 1 μ M) durch Valsartan (10 μ M) am Tag 4; Blockierung der Ang II-Wirkung (0,1 μ M) durch Valsartan (10 μ M) am Tag 7), während Ramiprilat keine Wirkung zeigte. Auch bei der Begutachtung der Zellmorphologie der Mesangiumzellen durch Hämatoxylinfärbung im Phasenkontrastmikroskop wurde eine Zellvolumenzunahme unter Ang II-Einfluss sichtbar. Untersuchungen der Egr-1-Expression auf mRNA-Ebene als Transkriptionsfaktor und somit Maß für Zellwachstum, zeigten eine konzentrationsabhängige Expressionszunahme mit einer Signifikanz bei 10 μ M Ang II (Faktor 2,5). Die Egr-1-Expressionssteigerung konnte durch Valsartan (1 μ M; 10 μ M) signifikant reduziert werden.

5.1 Methodische Diskussion

Zu Beginn dieser Arbeit wurde in Testreihen untersucht, welchen Einfluss die Zusammensetzung auf das Wachstumsverhalten der Mesangiumzellen ausübt (siehe 4). Dazu wurden Medien mit verschiedenen Zusätzen im MTT-Test verglichen. Untersucht wurden Medien mit unterschiedlichen Insulinkonzentrationen (0,01 μ M - 1 μ M), FCS-

Konzentrationen (0 % - 5 %) und zwei verschiedene Glukose-Konzentrationen (1,0 g/l; 4,5 g/l). In Folge der Testung wurde der Schluss gezogen, bei der geplanten Versuchsreihe unter Ang II-Stimulation auf Insulinzusatz zum Medium zu verzichten. Auch Untersuchungen anderer Gruppen lassen vermuten, dass Insulin und Ang II gegenseitig einen wachstumshemmenden Effekt aufzeigen [18;43]. Solow *et al.* beobachteten beispielsweise eine deutliche Zunahme der Expression des mitogenen Transkriptionsfaktors Egr-1 bei Insulinzugabe (100 nM) an Mesangiumzellen von Mäusen, Ang II (1 μ M) bewirkte ebenfalls eine erhöhte Expression gegenüber der Kontrolle, jedoch nicht im gleichen Ausmaß wie mit Insulin. Bei gleichzeitiger Gabe von Insulin und Ang II beobachteten sie eine erniedrigte Expression gegenüber der Probe mit Insulin alleine, aber eine erhöhte Expression gegenüber der mit Ang II behandelten Probe. Daraus schlossen sie, dass Ang II einen inhibitorischen Effekt auf die durch Insulin ausgelöste Expression hat [79]. Andere Untersuchungen zeigten, dass die Anwesenheit von Insulin für die kontraktile Antwort bei Ang II-Stimulation von Mesangiumzellen wichtig ist, selbst bei einer Stimulierung der Zellen mit 10 μ M Ang II, sonst bleibt sie aus [45]. Da FCS eine Mischung aus verschiedenen Wachstumsfaktoren (unter anderem auch Insulin) beinhaltet, wurde aus den gleichen Überlegungen heraus eine möglichst niedrige Konzentration an FCS (0,25 % und 0,4 %) angestrebt. Hinsichtlich der FCS-Konzentration wurde untersucht, ob Zellen unter Restriktion des FCS-Zusatzes im Medium ihre Zellvitalität einbüßen. Es konnte gezeigt werden, dass die Mesangiumzellen nach 7 tägiger Kultivierung (Mediumwechsel erfolgte alle 3 Tage) im MTT- und BrdU-Test und in der Zellzählung bei einem minimalen Gehalt von 0,25 %-FCS keine Wachstumsrestriktion nehmen. Bei der Testung des Glukosegehaltes wiesen die Versuchsreihen mit 4,5 g/l Glukose in Kombination mit Ang II-Stimulation tendenziell bessere Werte auf als nur mit 1,5 g/l Glukose. Möglicherweise ist dieser Effekt auf eine gegenseitige Verstärkung von Ang II und hohem Glukosegehalt zurückzuführen [92], so dass ein Medium mit 4,5 g/l Glukosegehalt verwendet wurde.

In Zellkultur können spezifische Zellpopulationen wie beispielsweise Mesangiumzellen unter kontrollierten Bedingungen ohne den Einfluss anderer Zellen spezifisch untersucht werden [44]. Somit können autokrine von parakrinen Wirkmechanismen selektiv unterschieden werden. Kritisch anzumerken ist jedoch, dass Zellen unter Kulturbedingungen nicht immer die gleichen Merkmale aufweisen, wie Zellen *in vivo*. Es scheint, dass sie phänotypische Modulationen durchmachen, die zu einem Verlust oder einer Abnahme bestimmter Eigenschaften führen, wie beispielsweise der Veränderung

der Rezeptordichte und Stimulierbarkeit der Zellen. Chamley *et al.* konnte an glatten Muskelzellen einen Verlust an Myosin, 9 Tage nachdem sie kultiviert wurden, zeigen [9]. Ähnliche Überlegungen sind hinsichtlich einer weiteren Alternative, Pharmaka auf ihre Wirksamkeit hin zu bewerten, zu stellen: dem Tierversuch. Auch hier können autokrine von parakrinen Wirkmechanismen nicht selektiv unterschieden werden. Zusätzlich muss auf artspezifische Eigenheiten in Bezug auf das RAAS einzelner Spezies hingewiesen werden [3];[17;30;48;49].

Um Zellen für eine Zellkultur zu gewinnen, gibt es verschiedene Techniken. So wird beispielsweise in einer Primärzellkultur zur Gewinnung von Glomeruluszellen der Ratte Nierenrindengewebe gepresst, gespült, durch spezielle Filter geführt und gesammelt. Man erhält somit ein Gemisch von glomerulären, vaskulären und tubulären Bestandteilen. Durch weitere Reinigungsverfahren, wie beispielsweise enzymatische oder biohistochemische Differenzierungen, können die gewünschten Zellen aufgezogen werden [43;74]. Dieses Verfahren ist jedoch sehr aufwendig und viele Zellen gehen dabei zugrunde. Ein völliges Ausschließen einer Kontamination der gewünschten Zellpopulation mit Zellen vom anderen Zelltyp kann nicht völlig ausgeschlossen werden, aus diesem Grunde wurden in dieser Arbeit klonierte Mesangiumzellen verwendet.

Bei der Klonierung von Zellen wird eine einzelne Zelle vervielfältigt, so dass durchgängig homogene Kolonien entstehen, ohne die Gefahr der Kontamination mit anderen Zellen [43]. Allerdings können klonierte Zellen einen Verlust ihrer vorherigen Eigenschaften aufzeigen [36].

5.2 Hypertrophie, Hyperplasie und Endoreduplikation

Veränderungen des Wachstumsverhaltens von Mesangiumzellen spielen eine wichtige Rolle bei der pathologischen Entwicklung vieler Glomerulonephritiden [80]. In Bezug dazu wurde in dieser Arbeit das Zellwachstum von Mesangiumzellen unter Ang II-Stimulation als entscheidender Agonist des RAAS untersucht. Sowohl die Fähigkeit der Zelle zur Proliferation (Hyperplasie mit einer Zunahme der Zellzahl), zur Hypertrophie (Erhöhung der Zellgröße ohne Zunahme im DNA-Gehalt) und zur Endoreduplikation (ein Anstieg am DNA-Gehalt und meistens auch der Zellgröße) unter Ang II-Einfluss wurde in dieser Arbeit berücksichtigt. Im Gegensatz zu Untersuchungen *in vivo*, wobei autokrine (Synthese und Sekretion von Wachstumsfaktoren einer Zelle mit Beeinflussung

anderer Zellen vom gleichem Zelltyp) von parakrinen (Synthese und Sekretion von Wachstumsfaktoren einer Zelle mit Beeinflussung anderer Zellen von anderem Zelltyp) Wachstumsmechanismen nicht spezifisch unterschieden werden können, wurde ein *in vitro* Modell der Mesangiumzellen der Ratte gewählt. In der Literatur gibt es keine einheitlichen Meinung zur Wachstumsantwort von Mesangiumzellen auf Ang II-Stimulation. Wolf *et al.* vermuteten, dass Ang II oder hoher Glukosezusatz ein „zweizeitiges Wachstumsverhalten“ an Mesangiumzellen von Mäusen bewirkt [90]. Dabei bezogen sie dieses „zweizeitige Wachstumsverhalten“ auf unterschiedliche Phasen im Zellzyklus. Wolf *et al.* beobachteten einen erhöhten ³H-Thymidineinbau ihrer Zellen nach einer Inkubationsdauer von 24 und 48 h mit Ang II oder hoher Glukose-Konzentration (4,5 g/l), während auf der anderen Seite Zellen mit einer Inkubationsdauer von mehr als 72 h einen signifikant geringeren ³H-Thymidineinbau gegenüber der Kontrolle zeigten [92]. Hier wurde ein durch Ang II- oder hohen Glukosezusatz ausgelöstes Wachstumsverhalten beobachtet, das zuerst eine kurzfristige selbst-limitierende Proliferation (Fähigkeit der Zelle die S- und G2-Phase zu erreichen) und später eine lange dauernde Zellvolumenzunahme („G1-Phase-Arrest“, siehe unten) beinhaltet [92;93]. Demgegenüber beobachteten Huwiler *et al.* bei Mesangiumzellen der Ratte in Zellkultur unter Einfluss von Ang II eine Zellhypertrophie mit erhöhter Zellgröße und Proteingehalt, jedoch keine Proliferation [37]. Die Messung der Proliferation mit ³H-Thymidineinbau erfolgte jedoch nur über einen Stimulationszeitraum von 24 h. Eng *et al.* vermuteten, dass Akkumulation von extrazellulärer Matrix nach einer anfänglichen Proliferation von Mesangiumzellen der Ratte zu einer Proliferationsinhibierung führt [16;19;55]. Ganz *et al.* beobachteten keine Proliferation (³H-Thymidineinbau) unter Ang II-Stimulation über eine Zeitdauer von 24 h, 48 h und 72 h [24]. In dieser Arbeit wurde eine geringe, aber signifikant erhöhte BrdU-Einbauraten bei Abnahme der Zellzahl, fehlender Toxizität und eine deutlich signifikante Hypertrophie unter Ang II-Stimulation nachgewiesen. Dies spricht für eine „Endoreduplikation“ unter Ang II-Stimulation. Der erhöhte BrdU-Einbau, wie in dieser Arbeit beobachtet, ist somit kein Ausdruck einer Proliferation, sondern einer Endoreduplikation und damit einer „irreversiblen Zellhypertrophie“ [81]. Endoreduplikation ist ein bei eukaryonten Zellen auftretender Prozess, bei dem es zur DNA-Amplifikation ohne Zellteilung kommt. Der Begriff der Endoreduplikation ist somit nicht mit Proliferation gleichzusetzen. Eine „irreversible Zellhypertrophie“ kann den pathogenen Einfluss des Ang II in einem

entkoppelten RAAS eines kranken Organismus wieder spiegeln und ist somit eine mögliche Erklärung bei der Pathogenese einer GN.

5.3 Einfluss des AT1-Antagonisten Valsartan auf die durch Ang II ausgelöste Endoreduplikation

Wie in dieser Arbeit gezeigt, vermag der AT1-Antagonist Valsartan sowohl BrdU-Einbau als auch Hypertrophie signifikant zu hemmen. Folglich ist der durch Ang II ausgelöste pathogene Wirkmechanismus einer „Endoreduplikation“ durch Blockade des AT1-Rezeptors günstig zu beeinflussen.

Inwieweit die Blockierung des AT1-Rezeptors Valsartan Einfluss auf die intrazellulären Vorgänge nimmt (Einfluss an G-Protein oder Thymidinkinasen gekoppelte Zellkaskaden, Wachstumsfaktorinduktion und Bedeutung des ROS; siehe Einleitung) und welche Rolle eine vollständige Blockade des AT1-Rezeptors der AT2-Rezeptor für das Wachstumsverhalten spielt, wäre Gegenstand weiterer Untersuchungen [32]. Abbildung 24 zeigt bislang bekannte Eigenschaften, die dem AT1- und AT2-Rezeptor zugeschrieben werden.

AT1-Rezeptor	AT2-Rezeptor
Plasma-Renin-Erhöhung	Vasodilatation
Angiotensin II-Erhöhung	Anti-proliferativer Effekt oder
Vasokonstriktion	Pro-apoptotischer Effekt
Aldosteron-Freisetzung	
Sympathikusaktivierung	
Kardiale Kontraktilität	
Renale Blutflusserhöhung	

Abbildung 24: Auflistung der Eigenschaften, die dem AT1- und AT2-Rezeptor zugeordnet werden [27]

5.4 Bedeutung des AT2-Rezeptors

Berk schrieb dem dominierenden AT1-Rezeptor „anti-apoptotische“ Eigenschaften zu, während der AT2-Rezeptor, als Gegenspieler, „pro-apoptotisch“ wirken soll. In dieser Arbeit konnte zwar eine Zellzahlabnahme unter Ang II-Stimulation nachgewiesen werden, jedoch fand sich sowohl unter Ang II als auch unter Valsartan keine Zunahme der Toxizität im LDH-Test. Apoptose spielt unter Valsartan, einem selektiven AT1-Rezeptorblocker, und somit ungeblockter AT2-Rezeptoraktivität eher eine untergeordnete Rolle. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen daher im Gegensatz zu der bislang vorherrschenden Meinung eher für einen „anti-proliferativen“ Effekt des AT2-Rezeptors und nicht für einen „pro-apoptotischen“ Effekt. Natürlich müssen gezielte Untersuchungen des Apoptoseverhaltens der Mesangiumzellen diese Vermutung bestätigen.

Inwieweit erhöhter BrdU-Einbau und erhöhte Zellhypertrophie mit resultierender Endoreduplikation von den intrazellulären Kaskaden (siehe Abbildung 6) gesteuert werden, möglicherweise sogar über zwei mehr oder weniger unabhängige Kaskaden separat voneinander ablaufen, wäre eine weitere interessante Frage. Weitere Versuchsreihen müssen dies zeigen.

Untersuchungen zeigten, bei einer durch hohe Glukose-Spiegel ausgelösten Zellhypertrophie, eine Abnahme dieser bei Zugabe von Anti-TGF- β Antikörper [92]. Da Ang II ebenfalls zur Induktion von TGF- β führt [41;50], könnten die TGF- β -vermittelten intrazellulären Kaskaden für die Zellhypertrophie durch Ang II verantwortlich sein. Im MTT-Test konnte in dieser Arbeit nach wiederholten Versuchen kein einheitliches Ergebnis unter Ang II-Stimulation erzielt werden. Vielmehr zeigten die Messwerte eine Schwankung im ca. 15 %-Bereich um den Wert der Kontrolle auf. Die MTT-Versuche zeigten jedoch, dass jegliche Veränderung durch das Ang II im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle durch Behandlung mit dem AT1-Antagonisten Valsartan wieder aufgehoben werden konnte. Auf welche Art und Weise das Valsartan dieses variable Wachstumsverhalten aufhebt und welche genauen intrazellulären Mechanismen daran beteiligt sind, ist Ziel weiterer Untersuchungen. Einen Einblick in die komplexen Interaktionswege und Signalkaskaden der Zelle gibt die Einleitung dieser Arbeit.

5.5 Bedeutung des „early growth response genes-1“ (Egr-1) als Wachstumsfaktor auf intrazelluläre Vorgänge

In dieser Arbeit wurde eine Zunahme der Egr-1-Expression unter Ang II (10 μ M) nachgewiesen. Rupprecht *et al.* beschrieb als erster Egr-1 als Transkriptionsfaktor und konnte auch zeigen, dass dieser Faktor bei der Pathogenese einer GN im Tiermodell eine entscheidende Rolle spielt [72]. Egr-1 (early growth response-1-gene), auch bekannt unter den Namen Krox-24, zif/268, NGFI-1A und TIS8, gehört zur Familie der „immediate early genes“. Es kodiert ein 75 bis 80 kDa nukleäres Phosphoprotein, welches drei Zinkfinger-Domänen besitzt. Es wird durch viele Faktoren induziert wie „platelet derived growth factor“ (PDGF), Arginin, Vasopressin (AVP), Serotonin, Ang II [71], hohen Glukosezusatz [78;89], aber auch mechanische Reizung und Strahlung [2;29;70]. Eine Hemmung des Egr-1 erreicht man mit Dexamethason, s-Nitrosogluthation (GSNO) und atrialem natriuretischem Peptid (ANP) [70]. Ebenso demonstrierten Hofer *et al.* durch Inhibition von Serum-induzierter Egr-1-Expression durch „antisense Oligonukleotide“ sowohl eine Reduktion des Serum-induzierten Egr-1 auf mRNA- und Protein-Ebene, als auch eine Reduktion der MZ-Proliferation. Der Effekt der „antisense Oligonukleotide“ auf MZ-Proliferation korrelierte eng mit der Fähigkeit derselben zur Hemmung des Egr-1-Proteins [35]. Innerhalb des Zellzyklus konnte eine „immediate gene“-Expression, wie c-fos, c-jun und Egr-1, zu Beginn der G1-Phase nachgewiesen werden [89]. Befindet sich eine Zelle im Ruhezustand, wird sie als „schlafende Zelle“ bezeichnet und befindet sich in der G0-Phase (Abbildung 25). Wird sie durch Wachstumsfaktoren oder Zytokine stimuliert, so tritt sie in die G1-Phase ein. Ein „G1-Arrest“ geht mit Antiproliferation und Hypertrophie einher, während ein „G1-Exit“ mit Apoptose assoziiert ist. Kommt es zu einem „G1-Transit“ in die S-Phase, so erreicht die Zelle die S-, G2-, und M-Phase. In der S-Phase verdoppelt die Zelle ihren Chromosomensatz auf 4n. In der folgenden G2-Phase finden Vorbereitungen für die M-Phase statt. Mit dem Ende der M-Phase ist die Mitose abgeschlossen.

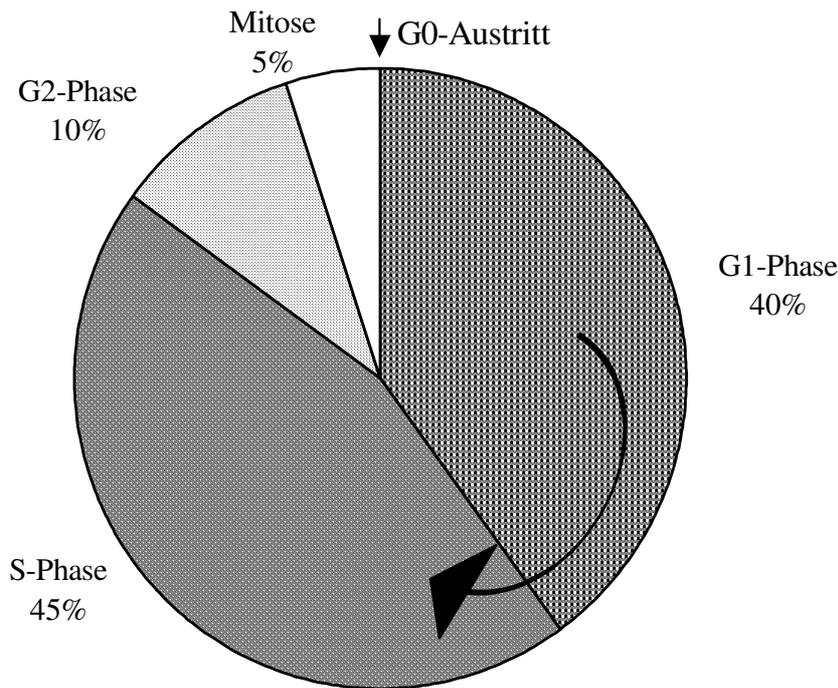


Abbildung 25: Zellzyklus mit seiner Aufteilung in G0-, G1-, S-, G2-Phase und Mitose

Untersuchungen zeigten, dass Ang II, TGF- β -vermittelt, eine Induktion von „Cyclin abhängigen Kinase“ (CDK)-Inhibitoren, wie p27^{KIP1} oder p21^{CIP1}, bewirkt [90]. CDK-Inhibitoren binden an einen Komplex aus Cyclin und „Cyclin-Dependent-Kinase“ (CDK). Dadurch verhindern sie einen Transfer aus der G1-Phase in die S-Phase. Es kommt zu einem „G1-Arrest“. In der G1-Phase kommt es zur Antiproliferation, Transkription von verschiedenen Genen, Protein-Synthese und zur Zellhypertrophie. Neueste Ergebnisse geben Hinweise, dass der CDK-Inhibitor p21 den Zellzyklus zusätzlich in der G2- und M-Phase inhibiert [78];[10]. Somit könnte eine Zellhypertrophie mit einer Zunahme an DNA-Synthese ohne Zellteilung und damit der Ablauf und Wirkmechanismus einer Endoreduplikation erklärt werden. Ophascharoensuk *et al.* und Hiromura *et al.* beobachteten, dass p27^{KIP1} - / - Mäuse eine höhere Apoptose aufwiesen als p27^{KIP1} + / + Mäuse [34;62]. Dies führte zu der Vermutung, dass Inhibitoren der CDK wie p27^{KIP1} zur Prävention von Apoptose wichtig sind [68]. Aus diesen Überlegungen wird von einem „anti-apoptotischen“- oder von einem „anti-proliferativen“ Effekt des Ang II gesprochen.

Mei *et al.* [58] konnten zeigen, dass durch Blockade des AT1-Rezeptors mit Losartan eine verminderte Expression von p27^{KIP1} resultiert. Somit ist eine Zellhypertrophie *via*

AT1-Rezeptor, p27^{KIP1}-gesteuert, wahrscheinlich. Eine zusätzliche Blockierung des AT2-Rezeptors könnte Aufschluss geben, ob und in wie weit der AT2-Rezeptor mit an der Regulierung des CDK-Inhibitors p27 und damit der Zellhypertrophie beteiligt ist.

In diesem Kontext ist das 110 kDa große Protein des Retinoblastom Genes (pRb) relevant [22;31]. Das pRb reguliert den G1/S-Phasen-Transit. Während der G0- und der frühen G1-Phase ist es hypophosphoryliert und damit aktiv. Es besitzt die Fähigkeit, den Transkriptionsfaktor E2F zu deaktivieren. Wird das pRb im Laufe der G1-Phase von den Cyclinen D und E phosphoryliert, wird es inaktiviert. Somit entfällt die Hemmung auf den Transkriptionsfaktor E2F, welcher an Promotor-Regionen bindet und weitere progressionsfördernde Zellzyklus-Mechanismen induziert [6]. Hierbei ist die Induktion der Thymidin-Kinasen und der „immediate early genes“, wie das Egr-1, hervorzuheben. In dieser Arbeit wurde eine ansteigende Konzentrations-abhängige Egr-1-Expression nachgewiesen (0,1 μ M; 1 μ M; 10 μ M). Eine Signifikanz zeigte sich erst bei 10 μ M. Vermutlich korreliert diese geringe aber signifikante Egr-1-Expression mit der Zunahme der DNA-Synthese, wie sie aus dem geringen, aber ebenso signifikanten BrdU-Einbau ersehen werden konnte. Die Aktivität des E2F und somit die Expression des Egr-1 führen offenbar zu einem vermehrten G1/S-Phasen-Transit der Zelle und somit zu einer erhöhten DNA-Synthese mit Endoreduplikation. Eine Hemmung der Egr-1-Expression durch Valsartan, wie sie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, scheint die Ausbildung einer Endoreduplikation der Mesangiumzellen abzuschwächen.

5.6 Lokales RAAS an Mesangiumzellen

Untersuchungen vieler Forschungsgruppen geben Hinweise auf das Vorhandensein eines unabhängigen lokalen RAAS neben einem übergeordneten systemischen RAAS. Dieses lokale RAAS ist gewebsgebunden und vermag Agonisten des RAAS selbst zu bilden, so dass es die Wirkung des systemischen RAAS lokal verstärken kann. Welche Bedeutung das lokale RAAS hat, ist Gegenstand zahlreicher Spekulationen, es scheint jedoch, dass es zur Regulierung ortsständiger Prozesse wichtig ist. Kubo *et al.* zeigten, dass Ang II einen Anstieg der mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAP-Kinasen) in der Media von Gefäßen auslöst. Weiterhin wiesen sie an Endothel-entfernter Aorta der Ratte in der Media das Vorhandensein von Renin, Angiotensin I und Angiotensin II nach. Gefäße von zuvor nephrektomierten Tieren wiesen eine deutlich verminderte MAP-Kinasen-Aktivität

auf. Die Abhängigkeit dieses auf die Media des Gefäßes beschränkten RAAS zu dem übergeordneten RAAS, insbesondere zu dem systemischem Renin, wird hiermit deutlich [46]. In einzelnen intrarenalen Kompartimenten wurden höhere Ang II-Konzentrationen gefunden als die gemessenen systemischen Ang II-Konzentrationen [50]. Auch ein unterschiedlicher Anstieg an ACE-Aktivität in einzelnen Kompartimenten der Niere bei Proteinbelastung konnte demonstriert werden. So kam es zu einem parallelen Anstieg des ACE in der Nierenrinde und der „renal brush boarder“, während das Nierenmark keine signifikanten Konzentrationsänderungen aufwies. Die erhöhte ACE-Aktivität in der „renal brush boarder“ korrespondierte mit einem ähnlichen Anstieg der Bindungen mit ^3H -Ramiprilat [26;59]. Dies lässt auf einen korrespondierenden Anstieg der ACE-Aktivität mit einem Anstieg der ACE-Konzentration schließen. Die Vermutung, dass einzelne Zellen ein vollständiges lokales RAAS besitzen, wie beispielsweise Endothelzellen [94] oder Mesangiumzellen, war der Hintergrund, weshalb in dieser Arbeit Ramiprilat trotz externer Ang II-Stimulation in seiner Wirksamkeit untersucht wurde. Ramiprilat zeigte in keinen der verwendeten Tests eine Wirkung. Somit muss von einem nicht vorhandenen lokalen RAAS der Mesangiumzellen ausgegangen werden oder angesichts der externen Stimulation mit Ang II von einem nicht zur Geltung kommenden lokalen System. Der AT1-Antagonist Valsartan zeigte in dieser Arbeit keine Hemmung der Ang II-Wirkung, die zu einem kleineren Messwert als der Wert der Kontrolle selbst geführt hat. Dies spricht ebenfalls für keine zusätzliche Ang II-Produktion im Rahmen eines lokalen RAAS.

6 Kritische Wertung und Ausblicke

Wesentliche Pathomechanismen einer mesangioproliferativen GN stellen die vermehrte Zellproliferation der Mesangiumzellen, eine Zellhyperplasie und schließlich eine vermehrte extrazelluläre Matrixakkumulation durch Mesangiumzellen dar. Diese Veränderungen führen im Verlauf der Erkrankung zu Strukturveränderungen an der glomerulären Filtrationsbarriere sowie zur zunehmenden Glomerulosklerose. Diese strukturellen Änderungen äußern sich klinisch anhand der Proteinurie und Nierenfunktionsverschlechterung, die zu Nierenversagen führen können. Zahlreiche Untersuchungen lassen vermuten, dass Ang II, nicht nur als Agonist des RAAS sondern auch als Wachstumsfaktor, entscheidend dazu beiträgt [37;58;63;79;90]. Der Erfolg der ACE-Hemmer und AT1-Antagonisten in klinischen Studien (REIN Studie, REIN follow-up Studie, AASK Studie, AIRE Studie, Micro-HOPE-Studie, RENAAL Studie, Plum *et al.*; siehe Einleitung) lässt vermuten, dass deren Wirkung nicht allein auf der Abschirmung hämodynamischer Effekte durch das Ang II, sondern vielmehr auch auf einer Hemmung anderer durch Ang II ausgelöster schädigender Interaktionen direkt an renalen Zellen beruht. Zur Untersuchung dieser direkten zellbiologischen Wirkungen des Ang II wurden in dieser Arbeit modellhaft Mesangiumzellen der Ratte aus einer Zellkultur gewählt, da sie aufgrund ihrer Eigenschaften entscheidend zur Funktion des Glomerulus beitragen. Als spezifisch auf Ang II wirkende Pharmaka wurden der ACE-Hemmer Ramiprilat und der selektive AT1-Antagonist Valsartan verwendet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deutlich, dass Ang II initial proliferationsfördernd wirkt, dann aber zu einem Wachstumsarrest der Mesangiumzellen führt. Gleichzeitig wurde eine Hypertrophie der Mesangiumzellen beobachtet. Beide Phänomene lassen sich als „Endoreduplikation“ der Mesangiumzellen bezeichnen, welche irreversibel werden kann, wenn Ang II in hohen Konzentrationen und unter längerer Stimulationsdauer seine physiologische Rolle verliert und die Zelle in ihrer Flexibilität, in Bezug auf äußere Einflüsse zu reagieren, einschränkt. Dieser Pathomechanismus kann an der Niere als „Glomerulusinsuffizienz“ bezeichnet werden. Valsartan, als selektiver AT1-Antagonist zeigte eine partielle, aber signifikante Hemmung dieser Endoreduplikation. Dies könnte die „nephroprotektiven“ Eigenschaften dieser Medikamentengruppe erklären. Der AT1-Antagonist war allerdings bei Langzeitwirkung von Ang II über 7 Tage in Bezug auf die Hypertrophie der Mesangiumzellen, welche analog zum Proteingehalt pro Zelle

gemessen wurden, in seiner Wirksamkeit eingeschränkt. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die schädigende Ang II-Wirkung an Mesangiumzellen nicht ausschließlich über den AT1-Rezeptor vermittelt wird. Vielmehr kann der Ang II-Effekt unter anderem durch eine Stimulierung des AT2-Rezeptor moduliert werden. Diese Ergebnisse machen deutlich, warum die molekulare Wirkung der AT1-Antagonisten nicht der Wirkung der ACE-Hemmer, welche zu einer geringeren systemischen Bereitstellung von Ang II an sich führen, gleichgestellt werden kann.

Die am AT2-Rezeptor vermittelte Ang II-Signalkette kann „anti-proliferativ“ wirken und vermutlich einen G1-Phasen-Arrest hervorrufen. Dieser letzte Aspekt könnte durch eine vermehrte Bereitstellung des CDK-Inhibitors p21 unter Ang II-Wirkung dargestellt werden. Dies und die Frage, welche intrazellulären Prozesse (G-Protein-vermittelte-Kaskaden; Thymidinkinasen-gekoppelte-Kaskaden; Aktivierung von Wachstumsfaktoren oder ROS) dafür ursächlich sind, sollte Gegenstand weiterer Forschung sein.

Die vermehrte Expression des „immediate early gene“ Egr-1 unter Ang II kann als Hinweis gelten, dass Egr-1 nicht nur im Rahmen einer Proliferation exprimiert wird, sondern auch zur Endoreduplikation beiträgt, vermutlich als Vorbereitung zu einem Eintritt in die S-Phase mit vermehrter DNA-Synthesebildung, jedoch ohne anschließende Zellteilung. Auch diese Frage sollte hinsichtlich der pathogenen Bedeutung von Egr-1 für eine GN Ausgangspunkt weiterer Forschung sein.

Die Existenz eines lokalen RAAS an Mesangiumzellen konnte in dieser Arbeit anhand der Experimente mit dem ACE-Hemmer Ramiprilat nicht bestätigt werden. Ausgeschlossen ist natürlich nicht, dass ein lokales RAAS auf Zellebene bei Vorhandensein mehrerer renaler Zelltypen beispielsweise in Cokulturen doch eine Rolle spielt. Zusammenfassend ist zuzusagen, dass die nephroprotektive Wirkung des AT1-Antagonisten Valsartan, wie sie in klinischen Studien (RENAAL-Studie, Plum *et al.*, siehe Einleitung) deutlich wird, in dieser Arbeit auf molekularer Ebene teilweise erklärt werden konnte. Eine Hemmung der Endoreduplikation durch Valsartan scheint günstig, da die Mesangiumzellen am Glomerulum vor einer irreversiblen Hypertrophie (und damit Insuffizienz), als Langzeiteffekt einer unphysiologisch hohen Ang II-Stimulation, zumindest partiell abgeschirmt werden.

7 Zusammenfassung

Einleitung: Eine Glomerulosklerose am Nephron ist zumeist mit einer Mesangiumzellproliferation oder -hypertrophie verknüpft. Bei klinisch hoher Evidenz werden biochemisch lokale und autokrine Effekte diskutiert, die zu einer Nephroprotektion durch ACE-Hemmer und AT1-Antagonisten führen. Es gibt widersprüchliche Veröffentlichungen zur Frage ob Angiotensin II (Ang II) eine Proliferation oder Hyperplasie an Mesangiumzellen auslöst und ob Ang II einen zytotoxischen Einfluss nimmt.

Methode: Nach „growth arrest“ wurden Ratten-Mesangiumzellen in aufsteigenden Konzentrationen mit Ang II (0,1 μM - 10 μM) bis zu 7 Tagen mit oder ohne Zusatz des AT1-Antagonisten Valsartan (0,01 μM - 10 μM) oder des ACE-Hemmer Ramiprilat (0,1 μM - 100 μM) stimuliert. Die Toxizität der verwendeten Agonisten sowie des Ang II wurde durch Messung der Laktat Dehydrogenase (LDH)-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle beurteilt. Eine Zellproliferation der Mesangiumzellen wurde mittels Bromodesoxy-Uridin-Assay (BrdU), im MTT-Test und nach Zellzählung in einer Neubauer Zählkammer untersucht. Die Zellhypertrophie wurde mit der Proteinmessung nach der Bradford-Methode pro Zelle ermittelt. Die Expression des „early growth response gene-1“ (Egr-1) als Wachstumsfaktor wurde nach 90-minütiger Ang II-Stimulation mit RT-PCR bestimmt und densitometrisch quantifiziert. Alle Experimente unter Ang II-Stimulation wurden in einem Insulin-freien Medium mit einem minimalen Zusatz von 0,25 % fetalen Kälber Serum (FCS) in Hinblick auf mögliche Interferenzen zwischen Ang II und Insulin durchgeführt.

Ergebnisse: Eine Toxizität von Ang II (0,1 μM bis 10 μM) bzw. der gebrauchten Pharmaka (Valsartan: 0,01 μM bis 10 μM ; Ramiprilat: 0,1 μM bis 100 μM) in den untersuchten Konzentrationen konnte im LDH-Test nach 3 Tagen Stimulation nicht nachgewiesen werden. Nach 5 Tagen Ang II-Stimulation konnte eine geringe, aber signifikante DNA-Synthese-Zunahme unter allen Ang II-Konzentrationen gemessen werden ($N=6\pm\text{SD}$; $p<0,05$; 0,1 μM Ang II = 116 %; SD = 0,0808). Die Expression des Egr-1 erhöhte sich ebenfalls nur um den Faktor 2,5 bei maximaler Stimulationsdosis (10 μM) von Ang II (Kontrolle = 34,52; SD = 17,25; 10 μM Ang II = 103,86; SD = 2,5). Beide Effekte wurden von Valsartan (10 μM Ang II + 10 μM Valsartan = 85,47; SD =

1,76), aber nicht von Ramiprilat inhibiert. Nach 4 und 7 Tagen löste Ang II eine signifikante Zellhypertrophie aus. Der Proteingehalt der Einzelzelle wurde unter Ang II (0,1 μ M) nach 4 Tagen verdoppelt ($0,1641 \pm 0,0183$) und nach 7 Tagen vervierfacht ($0,45 \text{ ng} \pm 0,048$) ($N=3 \pm \text{SD}$; $p < 0,01$). Auch hier wurde die Zellhypertrophie von Valsartan und nicht von Ramiprilat inhibiert.

Diskussion: Die beobachteten Effekte lassen eine „Endoreduplikation“ (DNA-Synthesezunahme ohne Zellteilung) unter Ang II-Stimulation an Mesangiumzellen erkennen. Endoreduplikation stellt eine irreversible Hypertrophie der Zelle dar, die Ausdruck eines pathologischen Wachstumsmechanismus ist und durch AT1-Antagonisten signifikant blockiert werden konnte. Diese Blockierung der Ang II-Wirkung wurde mit wachsendem Zeitintervall geringer. Die ausbleibende Effektivität des ACE-Hemmers Ramiprilat in diesen Experimenten spricht gegen ein lokales RAAS auf Ebene der Mesangiumzellen. Weitere Untersuchungen müssen folgen um die Rolle des AT2-Rezeptors nach AT1-Rezeptor-Inhibierung in der zellulären Signalkaskade bezüglich des Einflusses auf das Zellwachstum und Zellhypertrophie genauer zu kennzeichnen.

Veröffentlichung: Teile dieser Arbeit wurden auf dem Kongress der Gesellschaft für Nephrologie 2002 in Düsseldorf als Poster („Valsartan inhibits hypertrophy of angiotensin II stimulated rat mesangial cells and increases mRNA expression of Egr-1“) veröffentlicht [Kidney Blood press Res 2002; 25:152, PO55].

8 Literaturverzeichnis

1. Agodoa LY: The AASK-Study. *JAMA* 271:9-2728, 2001
2. Akai Y, Homma T, Burns KD, Yasuda T, Badr KF, Harris RC: Mechanical stretch/relaxation of cultured rat mesangial cells induces protooncogenes and cyclooxygenase. *Am.J.Physiol* 267:C482-C490, 1994
3. Akasu M, Urata H, Kinoshita A, Sasaguri M, Ideishi M, Arakawa K: Differences in tissue angiotensin II-forming pathways by species and organs in vitro. *Hypertension* 32:514-520, 1998
4. Bagchus WM, Jeunink MF, Elema JD: The mesangium in anti-Thy-1 nephritis. Influx of macrophages, mesangial cell hypercellularity, and macromolecular accumulation. *Am.J.Pathol.* 137:215-223, 1990
5. Ballermann BJ: Regulation of bovine glomerular endothelial cell growth in vitro. *Am.J Physiol* 256:C182-C189, 1989
6. Berk BC: Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanisms. *Physiol Rev.* 81:999-1030, 2001
7. Campbell DJ, Habener JF: Cellular localization of angiotensinogen gene expression in brown adipose tissue and mesentery: quantification of messenger ribonucleic acid abundance using hybridization in situ. *Endocrinology* 121:1616-1626, 1987
8. Cao XM, Koski RA, Gashler A, McKiernan M, Morris CF, Gaffney R, Hay RV, Sukhatme VP: Identification and characterization of the Egr-1 gene product, a DNA-binding zinc finger protein induced by differentiation and growth signals. *Mol.Cell Biol.* 10:1931-1939, 1990
9. Chamley JH, Campbell GR, McConnell JD: Comparison of smooth muscle cells from adult human, monkey, rabbit primary culture and in subculture. *Cell Tissue Res* 515-522, 1977
10. Chang BD, Broude EV, Fang J, Kalinichenko TV, Abdryashitov R, Poole JC, Roninson IB: p21^{Waf1/Cip1/Sdi1}-induced growth arrest is associated with depletion of mitosis-control proteins and leads to abnormal mitosis and endoreduplication in recovering cells. *Oncogene* 19:2165-2170, 2000
11. Christy B, Nathans D: DNA binding site of the growth factor-inducible protein Zif268. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86:8737-8741, 1989
12. Christy B, Nathans D: Functional serum response elements upstream of the growth factor-inducible gene zif268. *Mol.Cell Biol.* 9:4889-4895, 1989
13. Colussi DM, Parisot C, Rossolino ML, Brunner LA, Lefevre GY: Protein binding in plasma of valsartan, a new angiotensin II receptor antagonist. *J.Clin.Pharmacol.* 37:214-221, 1997

14. Criscione L, Bradley W, Bühlmayer P: Valsartan: preclinical and clinical profile of an antihypertensive angiotensin-II antagonist. *Cardiovasc.Drug Rev.* 13:230-250, 1995
15. Criscione L, de Gasparo M, Buhlmeier P, Whitebread S, Ramjouw HP, Wood J: Pharmacological profile of valsartan: a potent, orally active, nonpeptide antagonist of the angiotensin II AT1-receptor subtype. *Br.J.Pharmacol.* 110:761-771, 1993
16. Crowley ST, Brownlee M, Edelstein D, Satriano JA, Mori T, Singhal PC, Schlondorff DO: Effects of nonenzymatic glycosylation of mesangial matrix on proliferation of mesangial cells. *Diabetes* 40:540-547, 1991
17. Davi H, Tronquet C, Miscoria G, Perrier L, DuPont P, Caix J, Simiand J, Berger Y: Disposition of irbesartan, an angiotensin II AT1-receptor antagonist, in mice, rats, rabbits, and macaques. *Drug Metab Dispos.* 28:79-88, 2000
18. Dubey RK, Flammer J, Luscher TF: Angiotensin II and insulin induce growth of ciliary artery smooth muscle: effects of AT1/AT2 antagonists. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 39:2067-2075, 1998
19. Eng E, Floege J, Young BA, Couser WG, Johnson RJ: Does extracellular matrix expansion in glomerular disease require mesangial cell proliferation? *Kidney Int.Suppl* 45:S45-S47, 1994
20. Erley CM, Bader B, Scheu M, Wolf S, Braun N, Risler T: Renal hemodynamics in essential hypertensives treated with losartan. *Clin.Nephrol.* 43 Suppl 1:S8-S11, 1995
21. Frampton JE, Peters DH: Ramipril. An updated review of its therapeutic use in essential hypertension and heart failure. *Drugs* 49:440-466, 1995
22. Franch HA, Shay JW, Alpern RJ, Preisig PA: Involvement of pRB family in TGF- β -dependent epithelial cell hypertrophy. *J Cell Biol* 245-254, 1995
23. Gansevoort RT, de Zeeuw D, Shahinfar S, Redfield A, de Jong PE: Effects of the angiotensin II antagonist losartan in hypertensive patients with renal disease. *J.Hypertens.Suppl* 12:S37-S42, 1994
24. Ganz M, Perfetto M, Boron W: Effects of mitogens and other agents on rat mesangial cell proliferation, pH, and Ca⁺⁺. *Am.J.Physiol.* 259:269-278, 1990
25. Griendling K, Minieri C, Ollershaw J, Wayne Alexander R: Angiotensin II Stimulates NADH and NADPH Oxidase Activity in Cutured Vascular Smooth Muscle Cells. *Circ.Res.* 1141-1148, 1994
26. Grima M, Mosser J, Welsch C, Barthelmebs M, Imbs JL: [3H]ramiprilat binding to the angiotensin-converting enzyme in rat renal brush-border membranes: the effect of chloride. *Eur.J.Pharmacol.* 206:203-209, 1991
27. Grobecker H: *Angiotensin-II-Rezeptorantagonisten.* 1999

28. Haendeler J, Berk BC: Angiotensin II mediated signal transduction. Important role of tyrosine kinases. *Regul.Pept.* 95:1-7, 2000
29. Hallahan DE, Sukhatme VP, Sherman ML, Virudachalam S, Kufe D, Weichselbaum RR: Protein kinase C mediates x-ray inducibility of nuclear signal transducers EGR1 and JUN. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88:2156-2160, 1991
30. Handa RK: Influence of tissue fixation on the binding of (125)I-angiotensin receptor ligands in the rat, mouse and rabbit kidney. *Peptides* 23:1847-1852, 2002
31. Helt AM, Funk JO, Galloway DA: Inactivation of both the retinoblastoma tumor suppressor and p21 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is necessary to inhibit cell cycle arrest in human epithelial cells. *J Virol.* 76:10559-10568, 2002
32. Helt CE, Rancourt RC, Stavarsky RJ, O'Reilly MA: p53-dependent induction of p21(Cip1/WAF1/Sdi1) protects against oxygen-induced toxicity. *Toxicol.Sci.* 63:214-222, 2001
33. Herold G: *Innere Medizin.* 2001
34. Hiromura K, Pippin J, Fero I, Roberts M, Shankland SJ: Modulation of apoptosis by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27KIP1. *J Clin.Invest.* 103:597-604, 1999
35. Hofer G, Grimmer C, Sukhatme VP, Sterzel RB, Rupperecht HD: Transcription factor Egr-1 regulates glomerular mesangial cell proliferation. *J.Biol.Chem.* 271:28306-28310, 1996
36. Hruby Z, Lowry RP: Growth in vitro of cells from renal glomerulus. Difficulties in establishing long-term cultures of rat glomerular endothelium. *Int.Urol.Nephrol* 21:105-112, 1989
37. Huwiler A, Stabel S, Fabbro D, Pfeilschifter J: Platelet-derived growth factor and angiotensin II stimulate the mitogen-activated protein kinase cascade in renal mesangial cells: comparison of hypertrophic and hyperplastic agonists. *Biochem.J.* 305:777-784, 1995
38. Huwiler A, van Rossum G, Wartmann M, Pfeilschifter J: Angiotensin II stimulation of the stress-activated protein kinases in renal mesangial cells is mediated by the angiotensin AT1 receptor subtype. *Eur.J.Pharmacol.* 343:297-302, 1998
39. Inagami T, Iwai N, Sasaki K, Guo DF, Furuta H, Yamano Y, Bardhan S, Chaki S, Makito N, Badr K: Angiotensin II receptors: cloning and regulation. *Arzneimittelforschung.* 43:226-228, 1993
40. Jaimes EA, Galceran JM, Raj L: Angiotensin II induces superoxide anion production by mesangial cells. *Kidney Int.* 54:775-784, 1998
41. Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA: Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth

- factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells. *J.Clin.Invest* 93:2431-2437, 1994
42. Klett C, Bader M, Ganten D, Hackenthal E: Mechanism by which angiotensin II stabilizes messenger RNA for angiotensinogen. *Hypertension* 23:I120-I125, 1994
 43. Kreisberg JI, Hoover RL, Karnovsky MJ: Isolation and characterization of rat glomerular epithelial cells in vitro. *Kidney Int.* 14:21-30, 1978
 44. Kreisberg JI, Karnovsky MJ: Glomerular cells in culture. *Kidney Int.* 23:439-447, 1983
 45. Kreisberg JI, Karnovsky MJ, Levine L: Prostaglandin production by homogeneous cultures of rat glomerular epithelial and mesangial cells. *Kidney Int.* 22:355-359, 1982
 46. Kubo T, Saito E, Hosokawa H, Ibusuki T, Kambe T, Fukumori R: Local renin-angiotensin system and mitogen-activated protein kinase activation in rat aorta. *Eur.J.Pharmacol.* 365:103-110, 1999
 47. Kuhlmann MK, Kohler H: [The RENAAL Study. Effect of losartan on diabetic nephropathy]. *Internist (Berl)* 43:675-677, 2002
 48. Lansang MC, Hollenberg NK: ACE inhibition and the kidney: species variation in the mechanisms responsible for the renal haemodynamic response. *J Renin.Angiotensin.Aldosterone.Syst.* 1:119-124, 2000
 49. Lee BH, Lee SH, Jung YS, Seo HW, Yoo SE, Shin HS: Pharmacological characterization of KR-30988, a novel non-peptide AT1 receptor antagonist, in rat, rabbit and dog. *J Pharm.Pharmacol* 51:1191-1200, 1999
 50. Leehey DJ, Singh AK, Alavi N, Singh R: Role of angiotensin II in diabetic nephropathy. *Kidney Int.Suppl* 77:S93-8.:S93-S98, 2000
 51. Liu Y, Yang X, Sharov V, Nass O, Sabbah H, Peterson E, Carretero O: Effects of Angiotensin-converting Enzyme Inhibitors and Angiotensin II Type 1 Receptor Antagonists in Rats with heart Failure. *J.Clin.Invest* 99:1926-1935, 1997
 52. Lovett DH, Sterzel RB: Cell culture approaches to the analysis of glomerular inflammation. *Kidney Int.* 30:246-254, 1986
 53. Lüllmann H, Mohr K: *Pharmakologie und Toxikologie* 1999,
 54. Mayer AM, Brenic S, Glaser KB: Pharmacological targeting of signaling pathways in protein kinase C-stimulated superoxide generation in neutrophils-like HL-60 cells: Effect of phorbol ester, arachidonic acid and inhibitors of kinase(s) and phospholipase A2. *J Pharmacol Exp Ther* 633-644, 1996
 55. McLennan SV, Fisher E, Martell SY, Death AK, Williams PF, Lyons JG, Yue DK: Effects of glucose on matrix metalloproteinase and plasmin activities in mesangial cells: possible role in diabetic nephropathy. *Kidney Int.Suppl* 77:S81-S87, 2000

56. McMahon SB, Monroe JG: Activation of the p21ras pathway couples antigen receptor stimulation to induction of the primary response gene *egr-1* in B lymphocytes. *J.Exp.Med.* 181:417-422, 1995
57. McMahon SB, Monroe JG: The role of early growth response gene 1 (*egr-1*) in regulation of the immune response. *J.Leukoc.Biol.* 60:159-166, 1996
58. Mei X, Gao C, Cui R: [The role of AT1 receptor and cyclin kinase inhibitor p27 protein in angiotensin II-induced hypertrophy of mesangial cell]. *Zhonghua Nei Ke.Za Zhi.* 40:609-612, 2001
59. Michel B, Grima M, Coquard C, Welsch C, Barthelmebs M, Imbs JL: Effects of dietary protein and uninephrectomy on renal angiotensin converting enzyme activity in the rat. *Kidney Int.* 45:1587-1592, 1994
60. Molnar G, Crozat A, Pardee AB: The immediate-early gene *Egr-1* regulates the activity of the thymidine kinase promoter at the G0-to-G1 transition of the cell cycle. *Mol.Cell Biol.* 14:5242-5248, 1994
61. Murasawa S: Role of Calcium-Sensitive Tyrosine Kinase Pyk2/CAK β /RAFTK in Angiotensin II-Induced Ras/ERK Signaling. *Hypertension*668-675, 1998
62. Ophascharoensuk V, Fero M, Hughes J, Roberts J, Shankland SJ: The cyclin-dependent kinase inhibitor p27KIP1 safeguards against inflammatory injury. *Nature Medicine* 4:575-580, 1998
63. Orth SR, Weinreich T, Bonisch S, Weih M, Ritz E: Angiotensin II induces hypertrophy and hyperplasia in adult human mesangial cells. *Exp.Nephrol.* 3:23-33, 1995
64. Pavletich NP, Pabo CO: Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science* 252:809-817, 1991
65. Perez-Castillo A, Pipaon C, Garcia I, Alemany S: NGFI-A gene expression is necessary for T lymphocyte proliferation. *J.Biol.Chem.* 268:19445-19450, 1993
66. Plum J, Buntzen B, Nemeth R, Grabensee B: Treatment with the angiotensin II antagonist valsartan in patients with chronic renal failure and hypertension. *Nephrol.Dial.Transplant.* 14 Suppl 4:25-27, 1999
67. Qureshi SA, Cao XM, Sukhatme VP, Foster DA: v-Src activates mitogen-responsive transcription factor *Egr-1* via serum response elements. *J.Biol.Chem.* 266:10802-10806, 1991
68. Roninson IB: Oncogenic functions of tumour suppressor p21(Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. *Cancer Lett.* 179:1-14, 2002
69. Ruggenenti P: The REIN follow up-Study. *Lancet* 352:1252-1256, 1998
70. Rupperecht HD, Akagi Y, Keil A, Hofer G: Nitric oxide inhibits growth of glomerular mesangial cells: role of the transcription factor *EGR-1*. *Kidney Int.* 57:70-82, 2000

71. Rupperecht HD, Dann P, Sukhatme VP, Sterzel RB, Coleman DL: Effect of vasoactive agents on induction of Egr-1 in rat mesangial cells: correlation with mitogenicity. *Am.J.Physiol* 263:F623-F636, 1992
72. Rupperecht HD, Hofer G, Sterzel RB, Schocklmann HO: [Egr-1 transcription factor regulates the growth of glomerular mesangium cells]. *Med.Klin.* 92:68-73, 1997
73. Schadlich PK, Brecht JG, Brunetti M, Pagano E, Rangoonwala B, Huppertz E: Cost effectiveness of ramipril in patients with non-diabetic nephropathy and hypertension: economic evaluation of Ramipril Efficacy in Nephropathy (REIN) Study for Germany from the perspective of statutory health insurance. *Pharmacoeconomics.* 19:497-512, 2001
74. Scheinman J, Fish A, Brown D, Michael A: Human Glomerular Smooth Muscle (Mesangial) Cells in Culture. *Laboratory Investigation* 34:150-158, 1976
75. Schunkert H, Kindler J, Gassmann M, Lahn W, Irmisch R, Debusmann ER, Ocon-Pujadas J, Sieberth HG: Steady-state kinetics of ramipril in renal failure. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 13 Suppl 3:S52-4.:S52-S54, 1989
76. Sells SF, Muthukumar S, Sukhatme VP, Crist SA, Rangnekar VM: The zinc finger transcription factor EGR-1 impedes interleukin-1-inducible tumor growth arrest. *Mol.Cell Biol.* 15:682-692, 1995
77. Shahinfar S, Dickson TZ, Ahmed T, Zhang Z, Ramjit D, Smith RD, Brenner BM: Losartan in patients with type 2 diabetes and proteinuria: Observations from the RENAAL Study. *Kidney Int.Suppl*64-67, 2002
78. Shankland SJ, Wolf G: Cell cycle regulatory proteins in renal disease: role in hypertrophy, proliferation, and apoptosis. *Am.J Physiol Renal Physiol* 278:F515-F529, 2000
79. Solow BT, Derrien A, Smith JA, Jarett L, Harada S: Angiotensin II inhibits insulin-induced egr-1 expression in mesangial cells. *Arch.Biochem.Biophys.* 370:308-313, 1999
80. Sterzel RB, Lovett DH, Stein HD, Kashgarian M: The mesangium and glomerulonephritis. *Klin.Wochenschr.* 60:1077-1094, 1982
81. Sugimoto-Shirasu K, Stacey NJ, Corsar J, Roberts K, McCann MC: DNA topoisomerase VI is essential for endoreduplication in Arabidopsis. *Curr.Biol* 12:1782-1786, 2002
82. Sukhatme VP, Kartha S, Toback FG, Taub R, Hoover RG, Tsai-Morris CH: A novel early growth response gene rapidly induced by fibroblast, epithelial cell and lymphocyte mitogens. *Oncogene Res.* 1:343-355, 1987
83. Swedberg K, Pfeffer M, Granger C, Held P, McMurray J, Ohlin G, Olofsson B, Ostergren J, Yusuf S: Candesartan in heart failure--assessment of reduction in mortality and morbidity (CHARM): rationale and design. *Charm-Programme Investigators. J Card Fail.* 5:276-282, 1999

84. Tanaka R, Sugihara K, Tatematsu A, Fogo A: Internephron heterogeneity of growth factors and sclerosis-Modulation of platelet-derived growth factor by angiotensin II. *Kidney Int.* 4:131-139, 1995
85. The GISEN Group: The REIN Study. *Lancet* 349:1857-1863, 1997
86. The HOPE-Study Investigators: The HOPE-Study. *N Engl J Med* 145-153, 2000
87. Touyz RM, Endemann D, He G, Li JS, Schiffrin EL: Role of AT₂ receptors in angiotensin II-stimulated contraction of small mesenteric arteries in young SHR. *Hypertension* 33:366-372, 1999
88. Uchiyama-Tanaka, Matsubaru H, Nozawa Y, Murasawa S, Mori M, Kosaki A, Maruyama K, Masuki H, Shibasaki Y, Fujiyama S, Nose A, Iba O, Hasagawa A, Tateishi E, Higashiyama S, Iwasaka T: Angiotensin II signaling and HB-EGF shedding via metalloproteinase in glomerular mesangial cells. *Kidney Int.* 60:2153-2163, 2001
89. Wolf G, Heeger PS, Neilson EG: Proto-oncogenes as targets of hormone and growth factor actions in the kidney. *Contemp Issues Nephrol* 23:111-139, 1991
90. Wolf G: Cell cycle regulation in diabetic nephropathy. *Kidney Int.Suppl* 77:S59-66.:S59-S66, 2000
91. Wolf G, Harendza S, Schroeder R, Wenzel U, Zahner G, Butzmann U, Freeman RS, Stahl RA: Angiotensin II's antiproliferative effects mediated through AT₂-receptors depend on down-regulation of SM-20. *Lab Invest* 82:1305-1317, 2002
92. Wolf G, Sharma K, Chen Y, Ericksen M, Ziyadeh FN: High glucose-induced proliferation in mesangial cells is reversed by autocrine TGF-beta. *Kidney Int.* 42:647-656, 1992
93. Wolf G, Ziyadeh FN, Zahner G, Stahl RA: Angiotensin II-stimulated expression of transforming growth factor beta in renal proximal tubular cells: attenuation after stable transfection with the c-mas oncogene. *Kidney Int.* 48:1818-1827, 1995
94. Xiao F, Puddefoot JR, Vinson GP: The expression of renin and the formation of angiotensin II in bovine aortic endothelial cells. *Journal of Endocrinology* 204-214, 2000

9 Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Jörg Plum für seine wertvollen Anregungen, Diskussionsansätze, Unterstützung, Förderung und Geduld, die er mir entgegenbrachte.

Danken möchte ich auch Herrn Professor Dr. Bernd Grabensee, an dessen Lehrstuhl diese Arbeit angefertigt wurde.

Frau Dr. Cornelia Blume, der Projektleiterin, möchte ich danken für die ständige Betreuung meiner Doktorarbeit und Bereitschaft mir selbst am spätem Abend nach einem langen Tag Hilfe und Unterstützung zu leisten.

Besonders hervorheben möchte ich zwei „Biologen“: Frau Diplom-Biologin Danuta Sabuda-Widemann und Herr Dr. Bernd Tiemann. Erstere arbeitete mich in die Zellkultur ein und griff mir tatkräftig unter die Arme sowohl was die Planung als auch Durchführung der einzelnen Testreihen anbelangte (MTT, BrdU, LDH, Proteingehaltbestimmung). Ihre ständige Hilfsbereitschaft möchte ich hervorheben.

Dr. Bernd Tiemann danke ich für die Einführung und Betreuung zum Verständnis der PCR, für Anregungen und Verbesserungsvorschläge, für Tips und Tricks beim Formatieren meiner Doktorarbeit, für Korrekturlesungen, für Zeit und Geduld. Er hatte immer ein „offenes Biologenohr“ für meine „Medizinerprobleme“.

Ebenfalls danke ich Herrn Dr. Willers für die statistische Auswertung der „Proteingehaltbestimmung“.

Meiner Freundin Heike Gaug und ihrer Mutter möchte ich für ihr Korrekturlesen meiner Doktorarbeit danken.

Nicht zu vergessen sind die vielen Mitarbeiter des Hämatologischen, Nephrologischen, Neurologischen und Gynäkologischen Labors, die mir mit wertvollen Tips und Ratschlägen zur Seite standen.

Abschliessend möchte ich meinen Eltern Krystyna und Andreas Gogolok danken. Danken für ihre tatkräftige Unterstützung, konstruktive Kritik, Hilfe, Geduld und Liebe und dass sie mir die Möglichkeit gaben mich voll und ganz auf mein Studium zu konzentrieren.

10 Lebenslauf

Persönlich Daten:

Name	Natalia Ludmila Gogolok
Geburtsdatum	16.05.1977
Geburtsort	Oppeln (Polen)
Adresse	Heiligenstädter Straße 12 40595 Düsseldorf Deutschland
Eltern	Krystyna Gogolok Magister der Chemie; Organisationsprogrammiererin Andreas Gogolok Magister der Physik; Organisationsprogrammierer

Ausbildung:

1984-1988	Grundschule in Düsseldorf
1988-1997	Annette-von-Droste-Hülshoff-Gymnasium in Düsseldorf mit Abitur
1997-1999	Vorklinikum der Medizin an der Heinrich-Heine- Universität-Düsseldorf mit Physikum
1999-2000	Erster Klinischer Abschnitt an der Heinrich-Heine- Universität-Düsseldorf mit Erstem Staatsexamen
2000-2002	Zweiter Klinischer Abschnitt mit Zweitem Staatsexamen
2002-2003	Praktisches Jahr und Drittes Staatsexamen