

**Einfluss moderner Immunsuppressiva,
ACE-Hemmer, AT1-Rezeptorblocker
und Statine auf die Proliferation
von Mesangiumzellen aus einer
Rattenzellkultur**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

von

Danuta Sabuda-Wideman

aus Düsseldorf

Düsseldorf

2005

Gedruckt mit Genehmigung
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität

Referent: Prof. Dr. med. B. Grabensee

Korreferent: Prof. Dr. F. Wunderlich

Tag der mündlichen Prüfung: 27.04.2006

Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
Abb.	Abbildung
ACE	<i>Angiotensin-Converting-Enzyme</i>
AMP	Adenosin-monophosphat
Ang II	Angiotensin II
AP-1	<i>activator protein-1</i>
AT1-Rezeptor	Ang II-Rezeptor Typ-1
AT2-Rezeptor	Ang II-Rezeptor Typ-2
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BrdU	5-Bromo-2`desoxyuridin
cAMP	Zyklisches AMP
CDK	<i>cyclin-dependent-kinase</i>
c DNA	komplementäre DNA
COX-1	Cyclooxygenase-1
COX-2	Cyclooxygenase-2
CyA, CsA	Cyclosporin A
D, Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGF-R	EGF-Rezeptor
Egr-1	<i>early-growth-response-gen-1</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-tetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immuno sorbant assay</i>
EMSA	Bandshiftanalyse (<i>electrophoretic mobility shift assay</i>)
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ET-1	Endothelin 1
FCS	Fetales Kälberserum
FK-506	Tacrolimus
FPP	Farnesylpyrophosphat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat

G-Proteine	GTP-bindende Proteine
GTP	Guanosin-5`-triphosphat
h	Stunde (lat.: hora)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
HRP	Meerrettichperoxydase (<i>horse radish peroxidase</i>)
IC	Inhibierende Konzentration
IEG	<i>Immediate-Early-Gene</i>
IFN γ	Interferon γ
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IL	Interleukin
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
IMPDH	Inosin-Monophosphat- Dehydrogenase
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IS	Immunsuppressiva
kD, kDa	Kilodalton
LDH	Laktat-Dehydrogenase
L-NIL	L-N ⁶ -(1-Iminoethyl)-lysine
L-NMMA	L-N-Monomethyl-L-Arginin
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	mitogenaktivierte Protein- Kinase
min	Minuten
MMF	Mykophenolat Mofetil
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MPA	Mykophenolsäure
MTP	Mikrotiterplatten
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolim Bromid (oder Mitochondrialer Tetrazolium-Test)
MZ	Mesangiumzellen
MW	Molekulargewicht
NAD(P)H	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-(Phosphat)
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor-κB</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PDGF-R	PDGF-Rezeptor
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PG I ₂	Prostacyclin I ₂

PI 3-K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKC	C-Kinase (Proteinkinase C)
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
STAT	<i>signal transducer and activators of transcription</i>
TBE	Tris-Borat-Edta-Puffer
TETG	Tris-EDTA-Tween-Glycerol
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl-ethylendiamin
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>
TNF- α	<i>tumour necrosis factor α</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TxA ₂	Thromboxan A ₂

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
1.1 Mesangiumzellen und ihr Beitrag zur Progression der Glomerulonephritis	1
1.2 Faktoren, die mesangiale Proliferation beeinflussen	3
1.2.1 <i>Platelet-derived growth factor</i> (PDGF)	3
1.2.2 Angiotensin II (Ang II).....	6
1.2.3 Stickstoffmonoxid (NO)	10
1.3 Immediate-early-genes (IEG): c-fos, Egr-1	19
1.4 Einsatz von bestimmten Pharmaka als Inhibitoren der mesangialen Hyperplasie/Hypertrophie	20
1.4.1 Immunsuppressiva (IS)	20
1.4.2 ACE-Hemmer und AT1-Rezeptorblocker (ARB) - Modulatoren des RAAS ...	27
1.4.3 Statine	30
2. Ziel der Arbeit	34
3. Material und Methoden	36
3.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial	36
3.2 Zellkultur	41
3.2.1 Kulturmedium und Zusätze	41
3.2.2 Kultivierung der Zellen	41
3.2.3 Passagieren der Zellen	41
3.2.4 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	42
3.2.5 Stimulationsexperiment und Behandlung mit Medikamenten	43
3.2.5.1 Stimulationsmedium.....	43
3.2.5.2 Stammlösungen der Medikamente.....	44
3.2.5.3 Aufbau der Experimente.....	45
3.3 Untersuchung der Zellproliferation	46
3.3.1 Zellzahlbestimmung mittels Hämocytometer im Trypanblau-Test.....	46
3.3.2 BrdU-Assay	49
3.3.3 MTT-Test.....	49

3.3.4	LDH -Test zur Bestimmung von Zytotoxizität	50
3.4	Untersuchung der Hypertrophie	52
3.5	Quantifizierung der NO-Produktion	52
3.6	Bestimmung von Prostaglandinen durch Radio-Immuno-Assay	54
3.7	RNA-Analyse	54
3.7.1	RNA-Isolierung	54
3.7.2	RNA-Quantifizierung	55
3.7.3	Untersuchung der Genexpression mittels RT-PCR.....	56
3.7.3.1	cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA (Reverse Transkription).....	56
3.7.3.2	Polymerase-Kettenreaktion PCR	57
3.7.3.3	β -Actin-PCR zur Kontrolle der cDNA-Qualität.....	59
3.7.3.4	Elektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten	60
3.7.3.5	Sequenzierung von PCR-Produkten	61
3.7.4	mRNA-Analyse im Northern-Blot.....	61
3.7.4.1	Denaturierende Gelelektrophorese einzelsträngiger mRNA	62
3.7.4.2	Northern-Blot.....	63
3.7.4.3	Hybridisierung mit mRNA-spezifischen Gensonde	63
3.8	Untersuchungen von Proteinen	64
3.8.1	Proteinisolierung	64
3.8.2	Bradford-Test	65
3.8.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	65
3.8.4	Western-Blot	67
3.8.5	Nachweis von Proteinen – Immunfärbung	68
3.9	Isolierung von Kernproteinen.....	70
3.9.1	EMSA (<i>electrophoretic mobility shift assay</i>).....	71
3.10	Auswertung der Daten und Statistik.....	73
4.	Ergebnisse.....	74
4.1	Proliferation von Mesangiumzellen nach Stimulation mit FCS, PDGF-BB und IL-1β.....	74
4.2	Untersuchung der Proliferation von Mesangiumzellen unter dem Einfluss von IS	75
4.2.1	Einfluss von CyA, FK-506 oder MPA auf das Wachstum von Mesangiumzellen gemessen im Trypanblau-Test.....	75

4.2.2	DNA-Synthese von Mesangiumzellen nach der Behandlung mit CyA, FK-506 oder MPA	77
4.2.3	Einfluss von CyA, FK-506 oder MPA auf die Proliferation und Vitalität von Mesangiumzellen gemessen mittels MTT-Tests	79
4.2.4	Zytotoxische Wirkung von CyA, FK-506 oder MPA auf die Mesangiumzellen (LDH-Test).....	81
4.2.5	Zusammenfassung: Proliferationsversuche unter dem Einfluss von IS	83
4.2.6	Untersuchung der Genexpression von c-fos, Egr-1 und PDGF-B unter der Wirkung von MPA auf Mesangiumzellen mittels RT-PCR	83
4.2.7	Untersuchung von Transkriptionsfaktor AP-1 nach der Behandlung mit MPA (EMSA)	88
4.2.8	Einfluss von MPA auf PDGF-BB- und PDGFR β -Proteinexpression von Mesangiumzellen	89
4.3	Untersuchung der Proliferation von Mesangiumzellen unter dem Einfluss von einem ACE-Hemmer und einem AT1-Rezeptorblocker	92
4.3.1	Bestimmung der zytotoxischen Wirkung von Ramiprilat und Valsartan auf die Mesangiumzellen (LDH-Test).....	92
4.3.2	Proliferation der MZ nach Stimulation mit FCS und der Behandlung mit Ramiprilat oder Valsartan	94
4.3.3	Proliferation der MZ nach Stimulation mit Ang II und der Behandlung mit Ramiprilat oder Valsartan	95
4.3.4	Untersuchung der Hypertrophie	99
4.3.4.1	Proteingehaltsbestimmung nach Stimulation mit Ang II.....	99
4.3.4.2	Einfluss eines ACE-Hemmers und eines AT1-Rezeptorantagonisten auf die hypertrophische Wirkung von Ang II.....	100
4.3.5	Einfluss von Valsartan auf die Egr-1 Genexpression	101
4.4	Untersuchung der Proliferation von Mesangiumzellen unter dem Einfluss von Cerivastatin	102
4.4.1	Zytotoxische Wirkung von Cerivastatin auf die Mesangiumzellen (LDH-Test)	102
4.4.2	Antiproliferative Wirkung von Cerivastatin.....	104
4.4.3	Proliferation von Mesangiumzellen nach Behandlung mit Cerivastatin und einem iNOS-Hemmer	107
4.4.4	Untersuchung der iNOS nach Behandlung mit Cerivastatin	110
4.4.4.1	Quantifizierung der NO-Produktion	110
4.4.4.2	Einfluss von Cerivastatin auf die Genexpression von iNOS bestimmt durch Northern Blot-Analyse.....	113
4.4.4.3	Einfluss von Cerivastatin auf die Proteinexpression von iNOS	115
4.4.5	Proliferation von Mesangiumzellen nach Behandlung mit Cerivastatin und mit einem Cyclooxygenase-Hemmer	119

4.4.6	Untersuchung der COX-2 abhängigen Prostaglandinsynthese sowie der COX-2-Expression nach Behandlung mit Cerivastatin	121
4.4.6.1	Einfluss von Cerivastatin auf die Prostaglandinbildung.....	121
4.4.6.2	COX-2-Proteinexpression unter Wirkung von Cerivastatin	123
5.	Diskussion	128
5.1	Proliferation der Mesangiumzellen unter dem Einfluss von Immunsuppressiva	128
5.1.1	Zelluläre und molekulare Wirkmechanismen von CyA und FK-506	130
5.1.2	Zelluläre und molekulare Wirkung von MPA	133
5.1.3	Mögliche Bedeutung der Ergebnisse für die klinische Anwendung von MMF	142
5.2	Proliferationsuntersuchung von MZ unter dem Einfluss von Ramiprilat und Valsartan	143
5.2.1	Angiotensin II- Wirkung an Mesangiumzellen	143
5.2.2	Einfluss des AT1-Antagonisten Valsartan auf die durch Ang II vermittelten zellulären Effekte in Mesangiumzellen	147
5.2.3	Bedeutung der Ergebnisse für die klinische Anwendung von Valsartan	156
5.3	Antiproliferative Wirkung von Cerivastatin auf Mesangiumzellen.	158
6.	Zusammenfassung	169
7.	Literaturverzeichnis	173
8.	Veröffentlichungen	201
9.	Danksagung	203
10.	Eidesstattliche Erklärung	205

1. Einleitung

1.1 Mesangiumzellen und ihr Beitrag zur Progression der Glomerulonephritis

Die MZ unterliegen wie alle Zellen einem Gleichgewicht zwischen Proliferation und Wachstumshemmung. Dieses kann durch Entzündungsprozesse empfindlich gestört werden und dann, in Abhängigkeit von den jeweilig vorherrschenden Mediatoren, kann eine ungehemmte Proliferation der MZ ausgelöst werden. Diese mesangiale Zellproliferation spielt eine wichtige Rolle nicht nur bei mesangioproliferativen Glomerulonephritis (GN), aber auch bei weiteren Glomerulonephritisformen wie der minimal proliferierenden GN, der GN im Rahmen eines systemischen Lupusnephritis, oder diabetischen Nephropathie (Herold, 2001). Dies wird verständlich, wenn man sich die zentrale Stellung der MZ zwischen Blutgefäßen und Glomeruli klar macht. Einerseits führt eine mesangiale Hyperzellularität zu einer Gefügedilatation an der glomerulären Filtrationsbarriere und fördert somit das mit den jeweiligen GN-Formen verbundene nephrotische Syndrom. Die pathogenetischen Vorgänge umfassen andererseits neben der verstärkten Zellproliferation auch eine vermehrte Bildung von der extrazellulären Matrix sowie die Fähigkeit der Mesangiumzellen zur Synthese von wichtigen Zytokinen und Wachstumsfaktoren oder Enzymen (Review bei Haas et al., 1999), und dadurch können auch andere die Glomeruli erhaltende Strukturen vom Entzündungsprozess erfaßt und langfristig zerstört werden.

Die MZ unterliegt einem kontraktilen Stimulus, der durch vasoaktive Amine und Peptide, solchen wie Vasopressin, Noradrenalin, Angiotensin II (Ang II) oder Histamin und Thromboxan ausgelöst wird (Review bei Pfeilschiffer, 1989). Durch eine andauernde und nicht ausreichend antagonisierte Kontraktion der Mesangiumzellen werden die Filtrationsoberfläche der Basalmembran und der glomeruläre Ultrafiltrationskoeffizient reduziert, was letztendlich auch zu einem Abfall der glomerulären Filtrationsrate (GFR) führt (Ichikawa et Harris, 1991). Diese Effekte können aber durch vasodilatorisch wirksame Prostaglandine wie PGE₂ oder durch Stickstoffmonoxid (NO) aufgehoben werden, wodurch es zu einer Erhöhung des effektiven Plasmaflusses und der glomerulären Filtrationsrate kommt (Buschhausen et al., 2001; Schar Schmidt und Dunn, 1983; Bachmann und Mundel, 1994).

Die Mesangiumzelle proliferiert angeregt durch bestimmte Zytokine, Wachstumsfaktoren oder andere Reize und kann selber im Rahmen eines autokrinen Mechanismus Zytokine, Wachstumsfaktoren, vasoaktive Peptide und verschiedene Enzyme sezernieren. Als Auslöser der mesangialen Proliferation kommen vor allem Wachstumsfaktoren wie *platelet-derived growth factor-BB* (PDGF-BB), *epidermal growth factor* (EGF), *insulin-like growth factor* (IGF) und Zytokine wie Interleukin-1 β (IL-1 β) oder Interleukin-6 (IL-6) in Frage. Demgegenüber üben der *transforming growth factor β* (TGF- β), *tumor necrosis factor α* (TNF- α), Interferon γ (IFN- γ) inhibierende Effekte aus (Haas et al., 1999; Floege et al., 1991a,b).

Es gibt auch Hinweise, dass die Wirkung von TGF- β abhängig von dessen Konzentration sein kann. So zeigten Jaffer et al. (1989), dass niedrigere Konzentrationen von TGF- β (< 100 pg/ml) eine Zellproliferation auslösen, während hohe Konzentrationen (> 250 ng/ml) einen hemmenden Effekt ausüben.

Darüber hinaus sind Mesangiumzellen in der Lage, Phagozytose von Makromolekülen wie Immunkomplexen und höhermolekularen Proteinen durchzuführen und sind ein Bestandteil eines lokalen retikuloendothelialen Systems (Mene et al., 1989). Tierexperimentelle Daten deuten z. B. darauf hin, dass die Ang II-vermittelte mesangiale Aufnahme von Makromolekülen die Ausbildung einer glomerulären Sklerose beschleunigen kann (Grond et al., 1985).

Unter inflammatorischen Bedingungen, wie bei einer Glomerulonephritis wird eine vermehrte Freisetzung von NO beobachtet (Cattell, 1994,1999; Ketteler et al., 1994; Furuu et al., 1998). Dabei entsteht der erhöhte NO-Spiegel im Glomerulus nicht nur durch an die Entzündungsstelle angelangte Leukozyten aber auch durch die autokrine NO-Bildung von Mesangiumzellen (Cattell und Cook, 1995; Ketteler et al., 1994; Pfeilschifter et al., 1993). Die pathogenetische Bedeutung erhöhter NO-Konzentrationen in der Niere während der Progression der GN ist noch nicht klar definiert, denn einerseits dient sie der Abwehr der Erreger und kann die glomeruläre Filtration positiv beeinflussen, andererseits unterstützt sie die Zerstörung körpereigener Zellen und kann somit zu irreversiblen Schäden am Entzündungsort führen.

Die Wirkung von PDGF-BB, Ang II und NO wird in den folgenden Kapiteln ausführlicher beschrieben.

1.2 Faktoren, die mesangiale Proliferation beeinflussen

1.2.1 *Platelet-derived growth factor* (PDGF)

Der *platelet-derived growth factor* (PDGF) ist einer der zuerst beschriebenen Faktoren, der ursprünglich als aktiver Bestandteil des Blutserums (Kohler und Lipton, 1974; Ross et al., 1974) und später als ein aus Blutplättchen gewonnenes Protein identifiziert wurde (Antoniades et al., 1979; Heldin et al., 1979). Inzwischen belegten mehrere Studien, dass verschiedene Zellarten wie Fibroblasten, vaskuläre glatte Muskelzellen, endotheliale Zellen, Mesangiumzellen PDGF synthetisieren können (Review bei Heldin und Westermark, 1999).

PDGF kann die Vermehrung vieler Zelltypen anregen, löst Änderungen der Zellform und deren Motilität aus, induziert eine Reorganisation des Aktin-Filament-Systems und stimuliert die Chemotaxis (Floege et al., 1991; Heldin und Westermark, 1999).

PDGF ist ein Protein, das als kationischer Homo- oder Heterodimer vorkommt und aus einer 16 kD A-Kette und einer 14 kD B-Kette besteht, die über Disulfid-Brücken miteinander verbunden sind. Bis jetzt sind drei Isoformen von PDGF bekannt: PDGF-AA, PDGF-AB und PDGF-BB (Ross et al., 1986). Die PDGF-Isoformen binden an für sie entsprechende Rezeptoren, Tyrosin-spezifische Proteinkinasen. Dabei kann an den α -Rezeptor sowohl die A- als auch die B- Kette von PDGF binden, während sich an den β -Rezeptor nur die B-Kette anbindet. Auf diese Weise kann PDGF-AA nur das $\alpha\alpha$ -Rezeptor-Homodimer induzieren, während PDGF-AB sowohl das $\alpha\alpha$ -Rezeptor-Homodimer als auch das $\alpha\beta$ -Heterodimer und PDGF-BB alle drei Isoformen ($\alpha\alpha$ -, $\beta\beta$ -, und $\alpha\beta$ -Rezeptor) aktivieren kann (Heldin und Westermark, 1999).

Durch die Anbindung von PDGF an den Rezeptor wird dieser dimerisieren und durch die Autophosphorylierung aktiviert (Abboud et al., 1995; Heldin et al., 1998). Als Folge werden mitogenaktivierte Protein-Kinase (MAPK) Kaskaden, die u. a. Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI 3-K), Phospholipase C (PLC) γ 1, Ras-Raf-*mitogen-activated* Protein Kinase (MAPK) Kinase (MEK)-MAPK- [*extracellular-signal-regulated kinase* (ERK)1/2] und JNK umfassen, in Gang gesetzt (Bazenet et al., 1994; Choudhury et al., 1997; Heldin, 1992; Heldin et al., 1998, 1999; Kawano et al 2003; Abb. 1-1).

Ist eine MAP-Kinase aktiviert, leitet sie das Signal weiter, indem sie in der Zelle andere Proteinkinasen und genregulatorische Proteine phosphoryliert. Oft setzt innerhalb von Minuten nach der Stimulation einer Zelle durch Wachstumsfaktoren die Transkription bestimmter Gene, der so genannten *Immediate-Early-Gene* (IEG), ein. Bei dieser Transkriptions-Aktivierung spielt ein Proteinkomplex, der aus dem "Serumresponse"-Faktor (SRF) und Elk-1 besteht, eine wichtige Rolle. Dieser Komplex ist ständig an eine bestimmte DNA-Sequenz (das "Serumresponse"-Element) gebunden, die im Regulator-Bereich mehrerer IEG liegt, von denen eines *fos* genannt wird. Einmal aktiviert, wandert die MAP-Kinase aus dem Zytosol in den Kern, phosphoryliert Elk-1, das anschließend die Transkription des *fos*-Gens anschaltet.

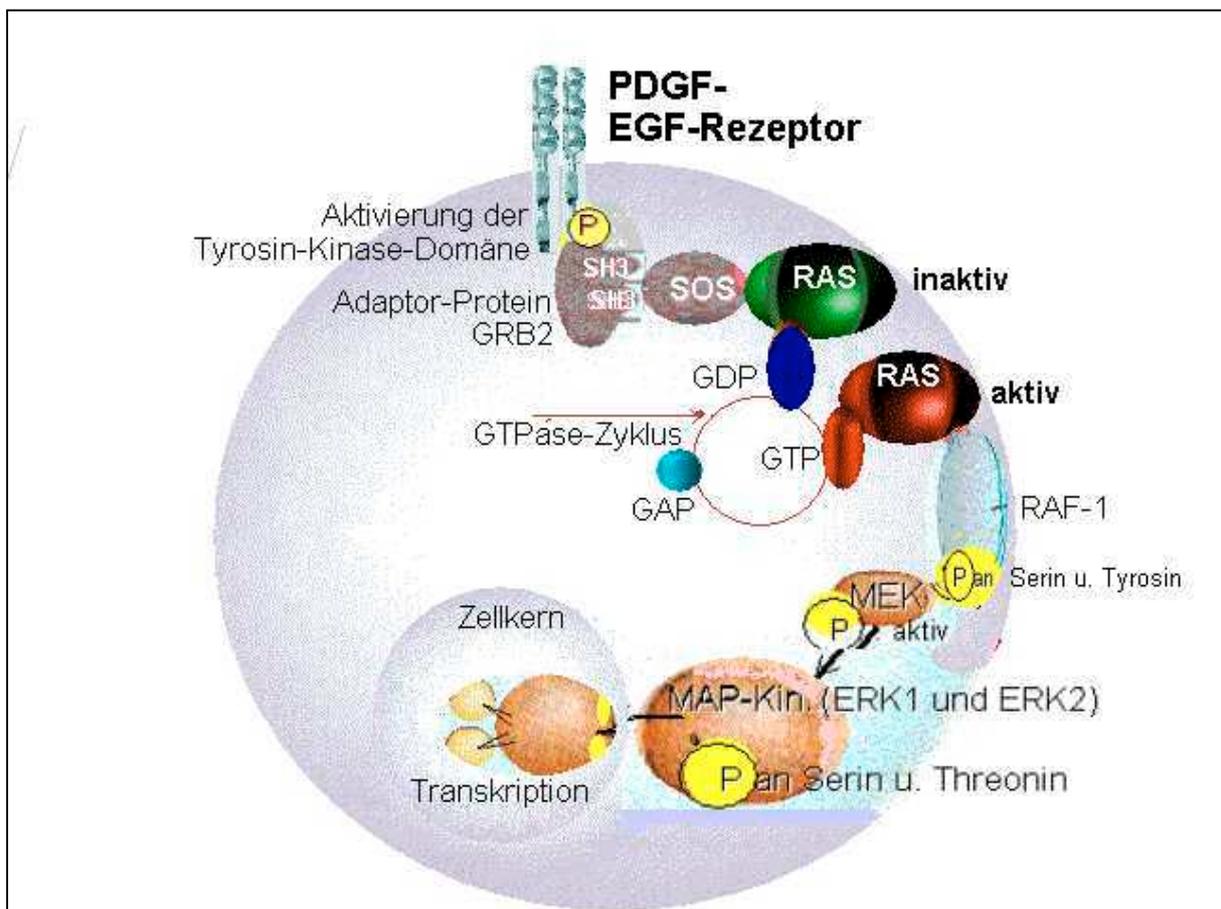


Abbildung 1-1: Signalübertragung von PDGF-Rezeptor über RAS/RAF/MAPK (ERK1/ERK2) Kaskade bis zum Zellkern (Schmoetzer-Gruenstadt: http://home.t-online.de/home/schmoetzer-gruenstadt/onko_k3.htm)

Zusätzlich können die MAP-Kinasen das Jun-Protein phosphorylieren, das zusammen mit dem neugebildeten *fos*-Protein ein aktives genregulatorisches Protein, das *activator protein-1* (AP-1) bildet, welches ebenfalls ein Transkriptionsfaktor ist. Jun kann auch direkt von der C-Kinase (PKC) phosphoryliert werden, die ebenso MAP-Kinase-Kaskade aktivieren kann (Alberts et al., 1995).

An kultivierten Mesangiumzellen wurde nachgewiesen, dass PDGF-BB durch eine Aktivierung der MAP-Kinase-Signalübertragung die Zellproliferation stimuliert (Huwiler et al., 1995). Des Weiteren zeigten Choudhury et al. (1996), dass PDGF auch über die Tyrosin-Phosphorylierung von Janus Kinase 1 (JAK1) den Transkriptionsfaktor aus der STAT-Familie (*signal transducer and activators of transcription*) aktivieren kann. JAK-Tyrosinkinase spielen auch eine essentielle Rolle bei der Aktivierung von Raf-1 (Marrero et al., 1997).

PDGF-BB gilt als stark mitogen wirkender Faktor für Mesangiumzellen (Floege et al., 1991a,b; Shultz et al., 1988). Eine erhöhte Expression von PDGF konnte sowohl bei der mesangioproliferativen Glomerulonephritis, der IgA-Nephropathie, der membranoproliferativen Glomerulonephritis und der Lupusnephritis als auch bei einer Abstoßungsreaktion in der Transplantatniere nachgewiesen werden (Abboud 1995; Gesualdo et al., 1991; Niemir et al., 1995; Yoshimura et al., 1991; Floege et al., 1993). Tierexperimentelle Untersuchungen ergaben, dass eine Injektion mit anti-PDGF-IgG Antikörpern oder mit Oligonukleotid-Aptamer-Antagonisten gegen PDGF-B bei Ratten mit mesangialer proliferativer Glomerulonephritis signifikant die Proliferation der MZ und Matrixexpansion reduzierte (Johnson et al., 1992; Ostendorf et al., 2001). In der Zellkultur wurde gezeigt, dass Mesangiumzellen nach der Stimulation mit PDGF-BB proliferieren und selber auch PDGF-BB produzieren (Abboud et al., 1987; Floege et al., 1991a; Shultz et al., 1988). Eine Inkubation der Mesangiumzellen mit anderen Faktoren u. a. EGF (*epidermal growth factor*), TNF- α (*tumour necrosis factor α*) oder bFGF (*basic fibroblast growth factor*) führt bei Mesangiumzellen auch zur Induktion von PDGF-mRNA und -Protein, was beweist, dass PDGF eine kritische Rolle als autokriner Wachstumsfaktor für die Proliferation der Mesangiumzellen darstellt (Silver et al., 1989).

Unter PDGF-BB soll auch über den *transforming growth factor β* (TGF- β)-abhängigen Mechanismus eine verstärkte Synthese von extrazellulären Matrix (ECM)-Proteinen wie Kollagen IV ausgelöst werden (Yamabe et al., 2000).

Als Transkriptionsfaktoren für PDGF-B wurden bis jetzt *activator protein-1* (AP-1), *specificity protein-1* (Sp1), *early-growth-response-gen-1* (Egr-1) und *nuclear factor- κ B* (NF- κ B) identifiziert (Khachigian et al., 1994; 1995; 1996; 1997; Liang et al., 1996; Rafty & Khachigian, 1998), deren erhöhte Expression und Aktivität ebenso bei renalen Krankheiten nachgewiesen wurde (Granger et al., 2000; Mezzano et al., 2001; Scharnhorst et al., 2000; Guijarro und Egidio 2001).

1.2.2 Angiotensin II (Ang II)

Angiotensin II stellt das primäre Effektorhormon des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) dar, das eine entscheidende Rolle in der Regulation des intravaskulären Flüssigkeitshaushaltes, des Gefäßwiderstandes und somit des Blutdrucks spielt.

Seit 1940 sind die systemischen und renalen gefäßverengenden Effekte von Ang II bekannt (Fasciolo, 1990; Page, 1990). Die Regulation der glomerulären Filtrationsrate (GFR) durch Ang II war einer der zuerst beobachteten Effekte dieses Hormons an der Niere. Durch Vasokonstriktion von glatten Muskelzellen erhöht Ang II den Tonus der glomerulären afferenten und efferenten Arteriolen und auf diese Weise wird die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) beeinflusst (Carmines und Fleming, 1990; Ichikawa und Harris, 1991). Dieses Oktapeptid wirkt vasokonstriktorisch einerseits durch direkte Aktivierung der glatten Muskelzellen und andererseits über die Freisetzung von Endothelin und Noradrenalin (Lüscher, 1995). Ang II löst auch eine Kontraktion der glomerulären Mesangiumzellen aus (Mene et al., 1989). Durch die Ang II vermittelte Kontraktion der Mesangiumzellen kommt es zu einer Vergrößerung von nichtselektiven Poren durch Dehnung, und in weiterer Folge zum Verlust der glomerulären Siebfunktion und dadurch zum Auftreten einer Proteinurie (Yoshioka et al., 1986).

Da alle RAS-Komponenten in proximalen Tubuluszellen (Braam & Koomans, 1996) und in Glomeruli (Atiyeh et al., 1995) vorhanden sind und Ang II intrarenal produziert werden kann, ist die Niere nicht nur auf die Zufuhr von RAS-Komponenten aus

extrarenalen Quellen angewiesen. Das zirkulierende Ang II soll sogar eine amplifizierende Wirkung auf die intrarenale Ang II Synthese haben (Von Thün et al., 1994).

Mehrere Untersuchungen der letzten Jahre belegen, dass Ang II nicht nur durch die vasokonstriktorische Einflüsse an der Progression der chronischen Niereninsuffizienz kausal beteiligt ist, sondern auch durch nicht-hämodynamisch vermittelte Mechanismen dazu beiträgt (Ichikawa et Harris, 1991; Wolf et Neilson, 1993, 1994). So wurde gezeigt, dass Ang II ein Wachstumsfaktor für renale Tubuluszellen ist (Wolf und Ziyadeh, 1997).

Ang II entfaltet seine Wirkungen über die Vermittlung von spezifischen Ang II-Rezeptoren, von denen bislang die Ang II-Rezeptoren Typ-1 (AT1-Rezeptor) und Typ-2 (AT2-Rezeptor) am besten charakterisiert sind (Bernstein und Berk, 1993; Timmermanns et al., 1991). Die meisten bekannten Ang II-Effekte (wie z. B.: Vasokonstriktion, Aldosteronfreisetzung, renale Natriumabsorption und kardiovaskuläre Hypertrophie) werden über den Typ-1 Rezeptor (AT1) vermittelt (Edwards und Aiyar, 1993). In den Nieren befinden sich mehr als 90% aller Rezeptoren vom AT1-Typ. Besonders hohe Konzentrationen sind in afferenten und efferenten glomerulären Gefäßen, Mesangiumzellen und verschiedenen Tubulusabschnitten lokalisiert (Edwards und Aiyar, 1993; Gröne et al., 1992; Sechi et al., 1992; Terada et al., 1993).

Der AT1-Rezeptor gehört zur Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Membranrezeptoren und hat ein Molekulargewicht von 65 kD (Helin et al., 1997; Murphy et al., 1991). Durch die Bindung von Ang II an den AT1-Rezeptor werden verschiedene Signaltransduktionswege aktiviert, die für das Wachstumsverhalten der Zellen entscheidend sind:

1. Es folgt eine Abnahme von dem zyklischen AMP (cAMP) sowie eine Aktivierung der Phospholipase C, was zu einem Anstieg von Inositol1,4,5-triphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) führt. Unter IP3 wird Kalzium aus intrazellulären Speichern freigesetzt, was eine Aktivierung von mehreren Kalzium-abhängigen Kinasen u. a. der Tyrosinkinase Pyk2 bewirkt. Durch DAG wird die Kalzium-abhängige Proteinkinase (PKC) aktiviert (Wolf, 1994; Mene et al., 1989; Marrero et al., 1996; Pfeilschifter, 1989; Berk, 2001). Ang II bewirkt eine Aktivierung von Kinasen wie

Raf-1 und ERK1/2 (Duff et al., 1992; Liao et al., 1996). Des Weiteren findet unter Ang II eine Stimulierung der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) statt, die die Serin/Threonin Kinase (AKT) aktiviert (Saward und Sahrada, 1997; Bai et al., 1999). Einige Studien erbrachten Hinweise darauf, dass Ang II über den AT1-Rezeptor direkt JAK2 und TYK2 stimulieren kann (Ali et al., 1997; Marrero et al., 1995; Marrero et al., 1997; Venema et al., 1998). Diese Tyrosinkinase phosphorylieren und aktivieren so die Transkriptionsfaktoren von der STAT-Familie, die für das Wachstum der vaskulären Muskelzellen erforderlich sind. JAK-Tyrosinkinase spielen auch eine essentielle Rolle bei der Aktivierung von Raf-1 (Marrero et al., 1997).

2. Ang II induziert die Transaktivierung von EGF-R und PDGF-R, die über die c-Src-Tyrosinkinase und das Adapterprotein Shc vermittelt wird. Über den SHC/GRB2/SOS-Komplex wird dann Ras aktiviert und der Signalweg über die MAP-Kinasen fortgesetzt (Eguchi et al., 1998; Eguchi und Inagami, 2000; Inagami et al., 1999; Kelly et al., 2004; Saito & Berk, 2001).

3. Ang II führt über den AT1-Rezeptor zu einer erhöhten Aktivierung von ROS (*reactive oxygen species*). Ang II stimuliert die NAD(P)H-Oxidase und trägt so zur erhöhten Bildung von Superoxid-Anionen (O_2^-) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) bei (Griendling et al., 1994; Jaimes et al., 1998; Zafari et al., 1998; Ushio-Fukai et al., 1998, 1999).

4. Ang II löst über den AT1-Rezeptor die Induktion von anderen Wachstumsfaktoren wie PDGF-A und -B (Berk und Rao, 1993; Weber et al., 1994; Li et al., 2001; Deguchi et al., 1999), TGF- β (Wolf et al., 1993; Kagami et al., 1994), ET-1 (Hahn et al., 1990), bFGF (Itoh et al., 1993) und IL-6 (Han et al., 1999) aus.

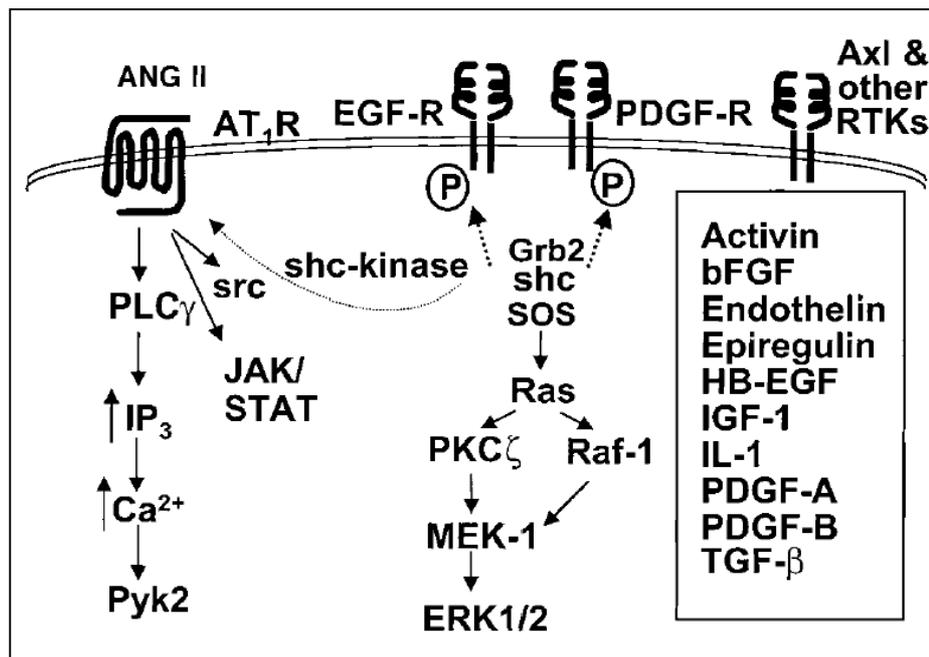


Abbildung 1-2: Angiotensin II-vermittelte autokrine Wachstumsmechanismen (Berk, 2001).

Alle durch Ang II aktivierten, in den Punkten 1-4 erwähnten Signalwege können zu einer verstärkten Zellproliferation oder Zellhypertrophie führen (Abb. 1-2).

Der AT₂-Rezeptor scheint nicht an G-Proteine gekoppelt zu sein, und seine Homologie zum AT₁-Subtyp beträgt 34% (Martin et al., 1994b). Über die Funktion des AT₂-Rezeptors liegen bisher wenige Befunde vor. Erste Beobachtungen jedoch deuten darauf hin, dass der AT₂-Rezeptor antipressorische, antichronotrope und proapoptotische Effekte vermittelt und sich somit möglicherweise antagonistisch zum AT₁-Rezeptor verhält (Masaki et al., 1998; Meffert et al., 1996; Yamada et al., 1996,1998).

In der Literatur gibt es kein einheitliches Muster zum Wachstumsverhalten von Mesangiumzellen nach Stimulation mit Ang II. Ergebnisse mehrerer Arbeitsgruppen weisen auf eine hypertrophierende Wirkung von Angiotensin II auf die Mesangiumzellen hin (Ganz et al.,1990; Huwiler et al.,1995; Schulze-Lohoff et al., 1993). Im Gegensatz zu diesen Autoren zeigten Wolf et al. (1992) und Orth et al. (1995) Angiotensin II als ein aktives Peptid, das bei Mesangiumzellen sowohl Hyperplasie (Vergrößerung eines Gewebes oder Organs durch einen Anstieg der Zellzahl) als auch Hypertrophie (Vergrößerung eines Gewebes oder Organs durch

eine Zunahme der Zellgröße mit einem Protein-Anstieg ohne Zellzahlzunahme) auslösen kann. Vielen Berichten zufolge führt eine durch Ang II erhöhte Synthese von TGF- β zu einer verstärkten Produktion von Matrixproteinen, und dies trägt zur Entwicklung der Zellhypertrophie bei (Kagami et al., 1994; Leehey et al., 2000; Wolf et al., 1993, 1995).

1.2.3 Stickstoffmonoxid (NO)

Obwohl die therapeutische Wirkung von Nitroglycerin bei der Behandlung von Angina pectoris seit mehr als einem Jahrhundert bekannt war, fand erst 1977 Murad heraus, dass Nitroglycerin NO freisetzt und dass dieses Gas glatte Muskelzellen relaxiert (Arnold et al., 1977). Ungefähr zu gleichen Zeit fanden Furchgott und Zawadzki heraus, dass das Endothel unter der Acetylcholinwirkung einen Botenstoff, nämlich den *endothelium derived relaxing factor* (EDRF) produziert, der die Entspannung der glatten Gefäßmuskelzellen auslöst (Furchgott und Zawadzki, 1980). 1986 stellten Ignaro und Furchgott unabhängig voneinander fest, dass der EDRF identisch mit NO ist (Ignaro et al., 1987).

Stickstoffmonoxid (NO) wird im normalen gesunden Glomerulus in Endothelzellen konstitutiv synthetisiert. Durch die Fähigkeit der Antagonisierung der vasokonstriktorischen Effekte von Ang II spielt NO eine sehr wichtige Rolle in der Regulation der glomerulären Hämodynamik (Bachmann et al., 1995; De Nicola et al., 1992).

Es ist auch bekannt, dass NO als lokaler Mediator von Makrophagen und neutrophilen Zellen gebildet wird und ihnen dabei hilft, eingedrungene Mikroorganismen abzutöten. Darüber hinaus kann NO als ein wichtiger Signal- und Effektormolekül in Säugerzellen eine Vielzahl von Prozessen auslösen und regulieren (Alberts et al., 1995).

NO-Biosynthese

In Zellen wird die NO-Bildung durch die Mitglieder einer Enzymfamilie katalysiert, die als NO-Synthasen bezeichnet werden. Bis heute wurden drei Isoformen identifiziert (Moncada et al., 1991; Nathan und Xie, 1994; Review bei Boucher et al., 1999), die Produkte verschiedener Gene darstellen und unterschiedlich lokalisiert und reguliert werden:

- die neuronale NOS oder nNOS (NOS-I) wird konstitutiv exprimiert, kommt hauptsächlich in Neuronen vor, wo sie als Neurotransmitter fungiert,
- die induzierbare NOS oder iNOS (NOS-II) wird durch Endotoxine und inflammatorische Zytokine wie IL-1 β oder TNF- α in Macrophagen und auch anderen Zellen u. a. Mesangiumzellen induziert,
- die endotheliale NOS oder eNOS (NOS-III) wird konstitutiv exprimiert, kommt hauptsächlich im vaskulären Endothel vor, wo sie für die Relaxation der darunter liegenden Gefäßmuskulatur zuständig ist.

Während die Aktivität der eNOS und der nNOS vom intrazellulären Kalziumspiegel abhängig ist, agiert die iNOS Kalzium-unabhängig, da diese NO-Synthase immer Calmodulin als fest gebundene Untereinheit mit sich führen kann (Cho et al., 1992). Der Grund der Kalzium-unabhängigen Bindung von Calmodulin an die iNOS wird in dem fehlenden Vorhandensein der sogenannten autoinhibitorischen Schleife in der Flavinmononukleotid (FMN)-bindenden Subdomäne der iNOS gesehen (Alderton et al., 2001).

Alle NO-Synthasen katalysieren eine Reaktion von L-Arginin (L-Arg), reduziertem β -Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) und Sauerstoff (O_2) zu $NADP^+$, L-Citrullin und NO und Wasser (Abb. 1-3, Review bei Boucher et al., 1999).

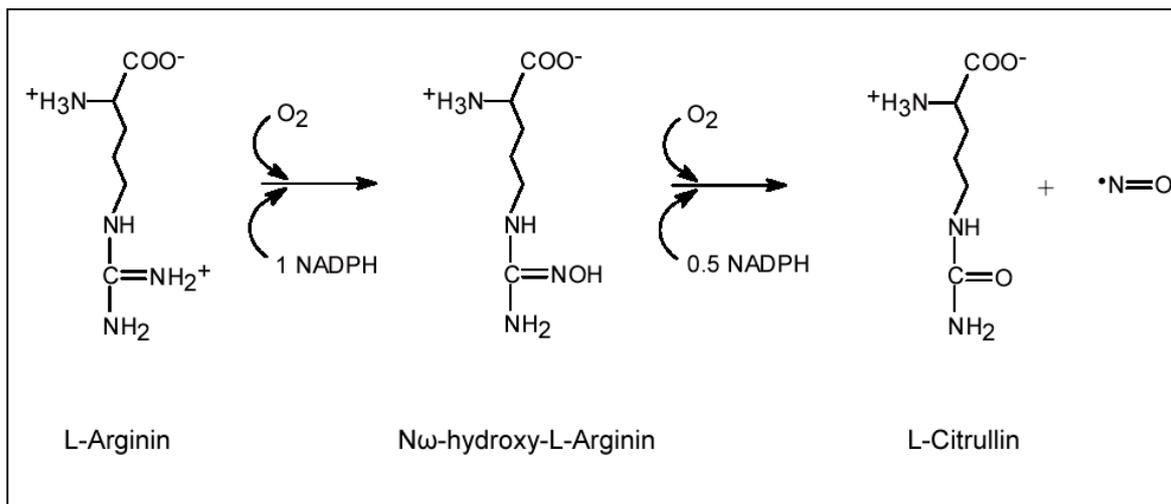


Abbildung 1-3: Vereinfachte Darstellung der durch NOS katalysierten Reaktion von L-Arginin zu L-Citrullin und NO.

Da bestimmte Cofaktoren an der Reaktion beteiligt sind, besitzen alle Isoformen entsprechende Bindestellen in der N-terminalen Oxygenase-Domäne für Eisen-Protoporphyrin IX (Häm), Tetrahydrobiopterin (BH₄), und L-Arginin und in der C-terminalen Reduktase-Domäne für NADPH, Flavinadenindinukleotid (FAD) und Flavinmononukleotid (FMN) (Review bei Boucher et al., 1999).

Die Reaktionen auf die Stimulation mit verschiedenen Zytokinen sind in Bezug auf die iNOS-Induktion sehr komplex und Zelltyp-spezifisch. Beispielsweise lösen Lipopolysaccharide (LPS) und Interferon γ (IFN- γ) eine starke Induktion von iNOS in Makrophagen aus, während unter TNF- α - und IL-1 β -Stimulation nur eine schwache Reaktion stattfindet. Im Gegenteil dazu reagiert die Mehrheit der Zellen wie Mesangiumzellen empfindlicher und mit einer starken iNOS-Induktion auf TNF- α und IL-1 β (Pfeilschifter und Schwarzenbach, 1990; Mühl et al., 1994). Des Weiteren wurde beobachtet, dass eine iNOS-Induktion sich einfacher bei Nagetierzellen als bei menschlichen Zellen auslösen lässt. Beispielsweise gilt das Zytokin IL-1 β als starker Stimulus für iNOS-Transkription in Mesangiumzellen aus der Ratte (Pfeilschifter und Schwarzenbach, 1990; Mühl et al., 1994), während eine sichtbare iNOS-Induktion bei menschlichen Zellen nur nach einer Behandlung mit mehreren Zytokinen wie IL-1 β , IFN- γ und TNF- α stattfinden kann (Nicolson et al., 1993).

Regulation der iNOS

Wird die iNOS einmal induziert, kann diese über einen längeren Zeitraum (mehrere Stunden bis mehreren Tagen) NO produzieren, solange das Enzym funktionsfähig ist und Substrat und Cofaktoren zu Verfügung stehen (Kröncke et al., 2000; Laurent et al., 1996). Die Regulierung der iNOS- Aktivität ist sehr wichtig, denn langfristig kann eine erhöhte NO-Menge bis zur Apoptose bzw. Nekrose der Zellen führen (Mühl et al., 1996; Mosley et al., 2000; Brüne et al., 1998a,b). Die Aktivität der iNOS wird einerseits durch NO selbst gehemmt (negative Rückkopplung) (Griscavage et al., 1993; Assreuy et al., 1993), andererseits lösen hohe NO-Konzentrationen sowie einige Zytokine (IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β) durch Herunterregulierung der iNOS-mRNA eine verminderte iNOS-Expression aus (Sheffler et al., 1995; Vouldoukis et al., 1997; Doyle et al., 1994; Vodovotz et al., 1993; Kunz et al., 1997).

Untersuchungen der Expression von iNOS deuten auf einen komplizierten Aufbau des Promotorbereichs hin, der mehrere Bindestellen für bestimmte Transkriptionsfaktoren aufweist. So wird eine Induktion von iNOS in Makrophagen aus der Maus über γ -aktivierte Regionen und IFN- γ *response* Elementbindungsstellen im iNOS-Promotor vermittelt (Xie et al., 1993; Martin et al., 1994). Für die Induktion von iNOS bei mit IL-1 β stimulierten Mesangiumzellen aus der Ratte ist das Anbinden von NF- κ B an für diesen Faktor bestimmte Stelle in der Promotorregion entscheidend (Eberhardt et al., 1994, 1998). Jedoch ist dies nicht die einzige Voraussetzung, da Endothelin die durch Zytokine induzierte iNOS-Expression ohne eine Beeinflussung der Bindung von NF- κ B hemmte (Beck und Sterzel, 1996). Bei der durch cAMP stimulierten iNOS-Induktion wurde eine erhöhte Bindung von Transkriptionsfaktoren CAAT/*Enhancer*-Bindungsprotein (C/EBP) und cAMP-*responsive* Element-Bindungsprotein (CREB) an die passende iNOS Promotorregion festgestellt (Eberhardt et al., 1998).

NO-Reaktionen

NO kann in verschiedenen Oxidationsstufen vorliegen. Die Halbwertszeit des NO-Radikals (Oxidationsstufe: +2) beträgt 6 – 30 sec und kann leicht konvertiert werden: Es kann zu Nitrosonium-Ion NO^+ (Oxidationsstufe: +3) oxidiert oder zu Nitroxyl-Ion NO^- (Oxidationsstufe: +1) reduziert werden. So stellt NO ein Molekül mit einem reduzierenden oder oxidierenden Potenzial dar, das mit anderen freien Radikalen, Thiolgruppen, Übergangsmetallen und molekularem Sauerstoff (O_2) reagieren kann (Stamler, 1994; Review bei Butler et al., 1995).

Bei einer der schnellsten Reaktionen zwischen NO und dem Superoxidanion (O_2^-) entsteht das sehr aktive Peroxynitrit (ONOO^-). Diesem werden einander widersprechende Effekte zugeschrieben. Einerseits hat diese Reaktion eine schützende Wirkung vor NO- oder O_2 -induzierten Zellschädigungen/Zelltod (Brüne et al., 1997; Sandau et al., 1997b). Andererseits werden dem Peroxynitrit DNA-schädigende Effekte zugeschrieben (Szabo et al., 1996). Peroxynitrit kann zu NO_2 und einem Hydroxylradikal zerfallen, das seine hohe Reaktivität aufweist und für seine biologisch destruktive Eigenschaft bekannt ist (Beckmann et al., 1990; Moro et al., 1994).

Bei höheren NO- Konzentrationen können als NO_x zusammengefasste höhere Stickoxide, wie z. B. NO_2 und N_2O_3 , entstehen. Diese Verbindungen haben ein wesentlich breiteres Reaktionsspektrum als NO und reagieren z. B. mit Thiol-Gruppen in Cystein-Resten (R-SH), wodurch S-Nitrosothiol-Gruppen (R-SNO) entstehen (Beckman und Koppenol, 1996; Gaston, 1999). Zielmoleküle in Zellen bei nitrosativem Stress können auch Proteine mit Metallionen wie Eisen, Zink oder Kupfer sein, wodurch deren Aktivität moduliert wird (Ignaro, 1990; Niketic et al., 1999; Stubauer et al., 1999; Kröncke und Carlberg, 2000).

Die NO-modulierte Signaltransduktion

Durch die Reaktion von NO mit prosthetischen Eisen- oder Thiol-Gruppen von Proteinen können diese aktiviert oder inhibiert werden, und auf diese Weise kann NO verschiedene intrazelluläre Transduktionswege beeinflussen. Eine der bekanntesten Reaktionen ist die Aktivierung der löslichen Guanylat-Zyklase (sGC) durch die Bindung von NO an die Häm-Gruppe (Ignaro, 1990). Die sGC katalysiert die Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP). Das cGMP dient als Botenstoff („*second messenger*“), das entscheidend für die Aktivität von cGMP-regulierten-Ionenkanälen und -Phosphodiesterasen (PDEs) und cGMP-abhängigen Proteinkinasen (PKGs) ist (Schmidt et al., 1993; Denninger und Marletta, 1999).

Durch eine Oxidation der Thiol-Gruppe eines Cystein-Restes zu einer Nitrosothiol-Gruppe wird die Aktivität vieler glykolytischen Enzyme wie Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH) (Mohr et al., 1994; Padgett und Whorton, 1995) sowie mancher Komponenten der zellulären Signaltransduktion wie Ras-Proteine (p21^{ras}) (Lander et al., 1995) und Proteinkinase C (PKC) (Gopalakrishna et al., 1993, Studer et al., 1996) modifiziert. Einerseits können hohe Konzentrationen von NO via S-Nitrosierung die Aktivität von PKC und dem Transkriptionsfaktor AP-1 blockieren, andererseits kann NO eine Aktivierung von p21^{ras} bewirken. Die durch Ras-Proteine initiierten Signaltransduktionswege aktivieren zum einen die Raf- MAPK-ERK1/2 Kinase-Kaskade (Chang und Karin, 2001), zum anderen die Phosphatidylinositol 3'-Kinase (PI3K)- Kaskade (Cantley, 2002). Diese beeinflussen die Aktivität mehrerer Transkriptionsfaktoren und die Transkription vieler Gene, die über die Proliferation oder den Zelltod entscheiden.

Ersten Beweis für NO-vermittelte Effekte auf Protein-Kaskaden lieferten Lander et al. (1993), die an T-Zellen zeigten, dass NO-freisetzende Verbindungen die Aktivität der Membran-assoziierten Protein-Tyrosin-Phosphatase stimulieren, die für die Dephosphorylierung und Aktivierung der zu der src- Protein-Familie gehörenden Tyrosin-Kinase p56^{lck} verantwortlich ist. Diese Gruppe zeigte auch 1996, dass NO drei bekannte MAPK-Kaskaden bei Jurkat T-Zellen aktivieren kann: die Stress-aktivierte Protein/cJun N-terminal-Kinase (SAPK/JNK)- Kaskade, die Stress-aktivierte p38 MAPK-Kaskade und die ERK/MAPK-Kaskade (Abb. 1-4).

Ähnliche stimulierende Effekte von NO wurden auch in glomerulären Mesangium- und Endothelzellen festgestellt (Pfeilschiffer und Huwiler, 1996; Callsen et al., 1998). Dabei kann NO entweder die verschiedenen Kinasen direkt beeinflussen oder ihre *up-stream* Faktoren wie das GTP-bindende Protein p21^{ras} modifizieren (Lander et al., 1995).

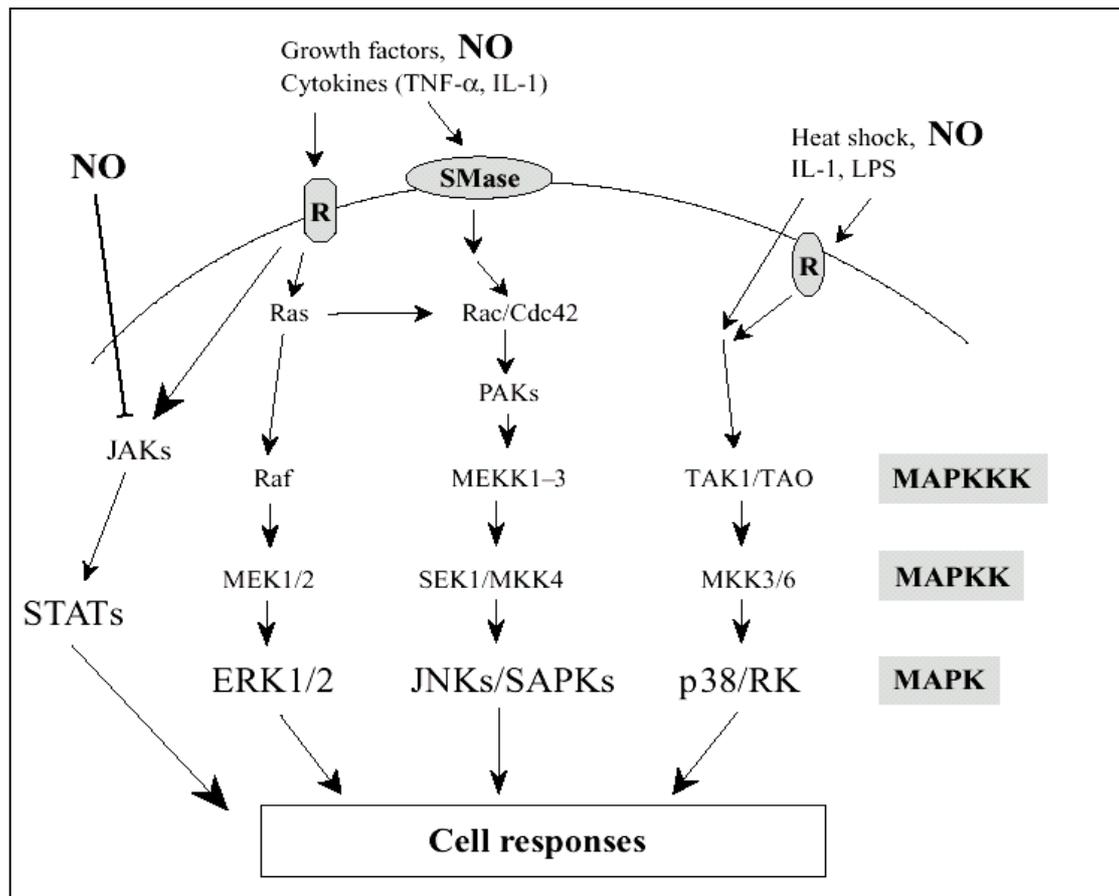


Abbildung 1-4: NO-vermittelte Signaltransduktionswege im Bereich der MAPK- und JAK-Kaskaden (Beck et al., 1999).

Ein Beispiel für eine direkte NO-Wirkung auf eine Proteinkinase stellt die S-Nitrosierung und Inaktivierung der JNK2/SAPK unter dem NO-Donor Nitrosoglutathion (GSNO) dar, wodurch antiapoptotische Effekte in B-Lymphozyten hervorgerufen wurden (So et al., 1998).

In Mesangiumzellen wurde eine supprimierende Wirkung von NO auf die Aktivität der Proteinkinase C beobachtet (Gopalakrishna et al., 1993, Studer et al., 1996). Auch eine andere Gruppe von Proteinkinasen, die Janus Kinasen (JAK2 und JAK3; Abb. 1-4) wird durch NO inhibiert (Duhe et al., 1998).

Die Aktivität von Redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und AP1 (Sen und Packer, 1996) kann ebenso unter dem Einfluss von NO modifiziert werden. Einerseits führte eine Behandlung von Mesangiumzellen mit NO-Donoren wie Natriumnitroprussiat (SNP), S-Nitroso-N-Acetylpenicillamin (SNAP) und GSNO zu einer verstärkten Bindungsaktivität von NF- κ B (Lander et al., 1993). Andererseits bewirkten diese NO-Donoren eine Hemmung der NF- κ B Bindungsaktivität bei anderen Zelltypen (Peng et al., 1995). Einen alternativen Mechanismus der NF- κ B Hemmung durch NO stellt eine erhöhte Expression und nukleare Translokation des Inhibitor-Proteins I κ B α , wie dies für die Genexpression von VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) in menschlichen Endothelzellen gezeigt wurde (Spicker et al., 1997). Matthews et al. (1996) konnten aber eine direkte Inhibierung der DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B Protein unter NO *in vitro* nachweisen.

In vitro konnte auch eine direkte Modifizierung der Aktivität von anderen Transkriptionsfaktoren wie AP1 (Tabuchi et al., 1994) oder Egr-1 (Berendji et al., 1999; Rupprecht et al., 2000) unter NO festgestellt werden. Die Inhibierung der Bindungsfähigkeit an die DNA von Egr-1 durch NO beruht auf einer Zerstörung der Zinkfinger-Strukturen durch S-Nitrosierung der Cysteine, die das Zink-Ion komplexieren, woraus eine Freisetzung von Zink-Ionen folgt (Kroncke und Carlberg, 2000).

Mehrere Untersuchungen der letzten Jahre erbrachten Hinweise, dass eine Vielzahl von Genen einer NO-kontrollierten Regulation unterliegt z. B. extrazelluläre Matrixproteine, Proteasen, Wachstumsfaktoren, Chemokine, Zytokine, Rezeptoren, Enzyme, und Hormone (Review bei Beck et al., 1999). Die Bedeutung dieser genregulatorischen Funktion ist noch nicht für alle Faktoren geklärt.

Das Wachstumsverhalten der Zellen unter NO

Da die molekulare Antwort der Zellen auf die NO-Wirkung unterschiedlich und von vielen Faktoren abhängig ist, lässt sich nicht eindeutig definieren, was dies für eine Zelle bedeutet.

Ergebnisse mehrerer Untersuchungen gaben Hinweise auf eine Apoptose-auslösende -Wirkung von NO nach einer iNOS-Induktion oder Behandlung mit NO-Donoren in verschiedenen Zellarten (Brüne et al., 1998b; Sandau et al., 1997a,b).

Dabei wurden typische Merkmale der Apoptose festgestellt, wie DNA-Fragmentierung durch aktive Endonukleasen, Chromatinkondensation, Externalisierung von Phosphatidylserin der Zellmembran, Zellschrumpfung, Abschnüren von „*apoptotic bodies*“, Aktivierung von Caspasen und Akkumulation von *tumour suppressor p53* (Meßmer et al., 1994; Meßmer und Brüne, 1996). Die Sensitivität der Zellen gegenüber endogenem oder exogenem NO kann in verschiedenen Zellarten unterschiedlich sein. So konnten NO-Donoren eine Apoptose in Makrophagen, Epithel-, Endothel- und Mesangiumzellen auslösen, während unter IL-1 β -Stimulation in Mesangiumzellen keine apoptotischen Merkmale zu beobachten waren (Nitsch et al., 1997; Mühl et al., 1996). Darüber hinaus zeigten Untersuchungen einer aus Epithel-, Endothel- und Mesangiumzellen bestehenden Cokultur, dass eine durch IL-1 β stimulierte iNOS-Induktion in Mesangiumzellen keine apoptotischen Veränderungen in den Endothel- und Epithelzellen auslöste. Sogar eine Preinkubation der Mesangiumzellen mit IL-1 β wies eine protektive Wirkung gegenüber einer durch exogenes NO-induzierten Apoptose auf (Mühl et al., 1996). Ergebnisse mehrerer Untersuchungen weisen daraufhin, dass eine länger dauernde NO-Bildung die Apoptose initiieren kann, dies ist jedoch von der Interaktion zwischen NO und O $_2^-$ abhängig (Brüne et al., 1997, 1998a; Sandau et al., 1997a, 1997b). Danach ist also die Balance zwischen pro- und antiapoptotischen Effekten sehr wichtig und entscheidet, ob durch NO destruktive oder protektive Mechanismen in den Zellen aktiviert werden. Die schützende Wirkung von NO soll möglicherweise über die Aktivierung der Cyclooxygenase-2 (COX-2), eines Schlüsselenzyms der Prostaglandinsynthese, vermittelt werden (Brüne et al., 1998a,b). Aufgrund der Induzierbarkeit von COX-2 durch mitogene und inflammatorische Reize spielt diese eine wichtige Rolle bei der Mitogenese und in entzündlichen Prozessen (Hershman, 1994). Einerseits kann NO eine amplifizierende Wirkung auf die mit IL-1 β induzierte COX-2-Expression haben (Tetsuka et al., 1996), andererseits kann die COX-2 über die Prostaglandinsynthese die Expression von iNOS beeinflussen (Tetsuka et al., 1994). Hierbei sollen PGE $_2$ bei niedrigeren Konzentrationen stimulierend auf die Expression der iNOS wirken, während höhere PGE $_2$ -Konzentrationen zu einer Expressionshemmung der iNOS führen können (Milano et al., 1995).

1.3 Immediate-early-genes (IEG): c-fos, Egr-1

Bei unterschiedlichen Entzündungsprozessen wird eine verstärkte Aktivierung von c-fos oder Egr-1 beobachtet. Beide sind Mitglieder der Genfamilie der *immediate-early-genes* (IEG).

Das **c-fos**-Gen kodiert für ein 62 kD nukleares Phosphoprotein, das nach einer mitogenen Stimulierung sehr schnell induziert wird. Viele Studien belegten, dass c-fos eine charakteristische zeitabhängige Expressionsintensität aufweist, schon nach einigen wenigen Minuten, maximal aber nach ca. 20 bis 30 min exprimiert wird und dann wieder auf seine ursprüngliche Transkriptionsrate abfällt (Schäfer et al., 1996; Kreisberg et al., 1994; Rupprecht et al., 1993)

In der Arbeit von Choudhury (1999) wurde gezeigt, dass PDGF-BB die Transkription von c-fos-Gen über die MAPK- Elk-1 Aktivierung induziert. Experimente von Hu et al. (1995) ergaben, dass die Genexpression von c-fos auch durch die PI-3-Kinase (Hu et al., 1995) über eine Aktivierung der Akt-Serin-Threonin-Kinase reguliert wird (Choudhury, 2001). Wie Choudhury (2001) zeigte, führte eine Inhibition von Akt zur Reduktion der Elk-1-abhängigen c-fos Transkription und zu einer kompletten Hemmung der DNA-Synthese bei mit PDGF stimulierten Mesangiumzellen.

Das fos-Protein bildet zusammen mit dem jun-Protein den Protein-Komplex AP-1 (*activator protein-1*), das als Transkriptionsfaktor die Aktivität vieler Gene reguliert (Karin et al., 1997), von denen manche an inflammatorischen Prozessen im Glomerulum beteiligt sind (Granger et al., 2000; Johnson et al., 1994; Mezzano et al., 2001). Eine verstärkte c-fos-Expression wurde bei Patienten mit einer Lupusnephritis, einer IgA Nephritis und einer fokal-segmental sklerosierenden GN detektiert (Takemura et al., 1996).

Das **Early-growth-response-gen-1 (Egr-1)**, bekannt auch unter dem Namen: zif268, Krox 24, Tis 8 oder NGFI-A wird ebenso nach einer mitogenen Stimulierung schnell und transient induziert (Rupprecht et al., 1992a, 1993). Das Gen kodiert für ein nuklear lokalisiertes DNA-Bindeprotein mit einem Molekulargewicht von 75 bis 80 kD. Seine DNA-Bindungsfähigkeit wird über drei Zinkfinger motive vermittelt, welche die Konsensussequenz 5'-GCG(G/T)GGGCG-3' innerhalb der Promotorregion von

Zielgenen erkennen (Cao et al., 1990; Pavletich et al., 1991; Sukhatme et al., 1988), woraus eine transkriptionelle Aktivierung oder Hemmung von Genen resultiert. Mehrere Untersuchungen konnten die Funktion von Egr-1 als Transkriptionsfaktor belegen (Gupta et al., 1991; Kinane et al., 1994; Lemaire et al., 1990; Molnar et al., 1994). Egr-1 nimmt an der transkriptionellen Regulation vieler Gene des Endotheliums teil, die u. a. umfassen: PDGF-A, PDGF-B, *tissue Faktor* (TF), *transforming growth factor β* (TGF- β), und *urokinase-type plasminogen activator* (Khachigian und Collins, 1997; Silvermann und Collins, 1999).

Mehreren Hinweisen zu Folge korreliert eine Egr-1 Induktion mit einer starken Proliferation der Zellen. So wurde gezeigt, dass eine Egr-1-Induktion sowohl nach mitogener Stimulierung von Mesangiumzellen in Kultur erfolgt als auch in der proliferativen Anti-Thy-1.1-Nephritis *in vivo* auftritt (Rupprecht et al., 1992, 1993, 1997). Mit Hilfe der Antisense-Oligonucleotid-Strategie zeigte Rupprecht et al. (1997), dass die Egr-1-Induktion einen essentiellen Bestandteil der mitogenen Signaltransduktionskaskade in kultivierten Mesangiumzellen darstellt. Carl et al. (2003) lieferten Beweise, dass eine Hemmung des Egr-1 Proteins durch den Transfer der gegen Egr-1 gerichteten Antisense-Oligonukleotide (AS ODN) zu einer Reduktion der experimentellen mesangioproliferativen Glomerulonephritis führte. Folgende Änderungen wurden dabei festgestellt: eine Verminderung der Hyperzellularität und der Mitosezahl, eine Reduktion der glomerulären Fläche und eine Reduktion der PDGF-B-Expression, was anscheinend durch die Hemmung von Egr-1-Protein bedingt worden war.

Es gibt aber auch Berichte über einen Zusammenhang zwischen der Egr-1-Induktion und einer Anti-Proliferation und Apoptose der Zellen (Liu et al., 1998; Lee et al., 2004).

1.4 Einsatz von bestimmten Pharmaka als Inhibitoren der mesangialen Hyperplasie/Hypertrophie

1.4.1 Immunsuppressiva (IS)

Eine Therapieoption für verschiedene Formen der Glomerulonephritis bilden derzeit Immunsuppressiva wie z. B. Cyclosporin A (CyA oder CsA), FK-506 (Tacrolimus) und Mykophenolat Mofetil (MMF).

Cyclosporin A, FK-506 (Tacrolimus)

Cyclosporin A (CyA) ist ein lipophiles zyklisches Peptid, das aus dem Bodenpilz *Tolypocladium inflatum Gams* isoliert wurde. Bei FK-506 (Tacrolimus) handelt es sich um makrozyklisches Antibiotikum, das aus *Streptomyces Tsukubaensis* gewonnen wurde.

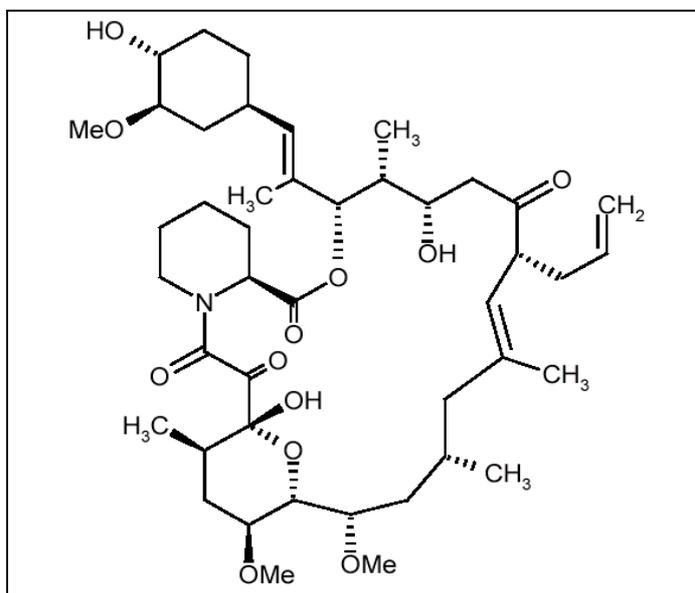
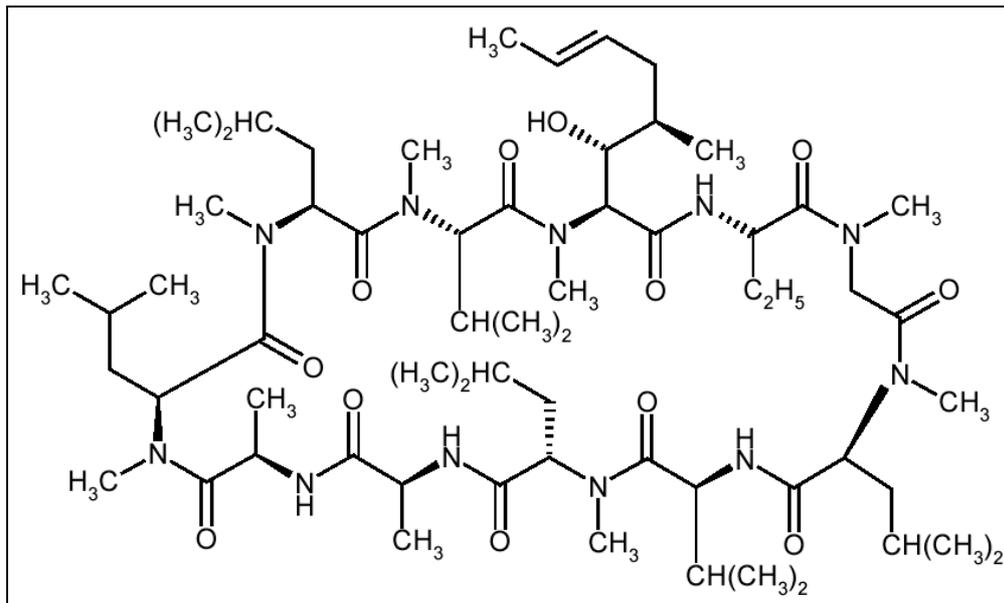


Abbildung 1-5:

Strukturformel von:
CyA (oben)
FK-506 (links).

Obwohl strukturell beide Immunsuppressiva so unterschiedlich sind (Abb. 1-5), gehören sie funktionell in die Klasse der Calcineurin-Inhibitoren, das heißt, durch gebildete Medikament-Immunoophilin-Komplexe und ihr Binden an Calcineurin-Calmodulin wird die Phosphatase-Aktivität von Calcineurin gehemmt (Abb. 1-6).

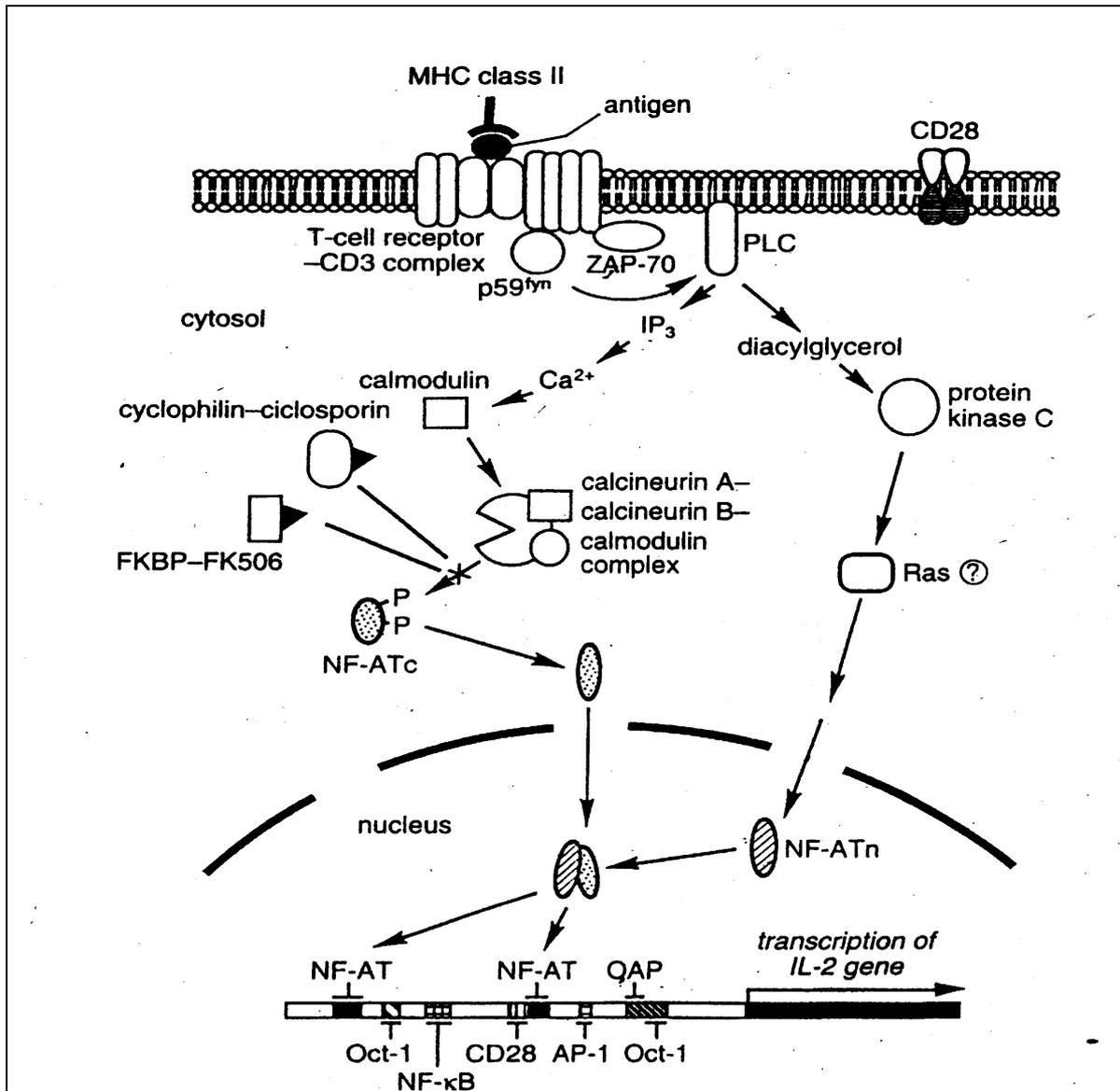


Abbildung 1-6: Wirkungsmechanismus der Calcineurin-Inhibitoren: Cyclosporin A und FK-506 an T-Zellen. FKBP: FK-506-binding Protein; NF-ATc: zytoplasmatische Komponente des nuklearen Faktors der aktivierten T-Zellen; NF-ATn: nukleare Komponente des NF-AT (Liu, 1993).

Dabei bildet CyA einen Komplex mit Cyclophilin und FK-506 mit dem FK-bindendem Protein (FKBP). Die Hemmung des Calcineurins verhindert die Dephosphorylierung und somit die Translokation von NF-ATc von Zytoplasma in den Kern. Auf diese Weise wird die Expression und Produktion von für die Proliferation der T-Zellen wichtigen Zytokinen (IL-2) und IL-2 Rezeptoren blockiert (Clipstone & Crabtree 1992, 1993, Liu et al. 1991,1992,1993, O'Keefe et al. 1992, Fruman et al. 1992, Flanagan et al. 1991).

Die als Langzeittherapie notwendige Behandlung von nierentransplantierten Patienten mit diesen Immunsuppressiva führt durch eine vielfach beschriebene Nephrotoxizität häufig zu einer akuten oder chronischen Schädigung der Niere.

Die Nephrotoxizität von CyA und FK-506 äußert sich u. a. durch eine Reduktion des renalen Plasmaflusses (RPF), der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und der "*single-nephron*"-glomerulären Filtrationsrate (SNGFR) (Demetris et al., 1991; Shapiro et al., 1993; Nalesnik et al., 1987; Barros et al., 1987, 1990, Hadad et al., 1995). Hämodynamische Ereignisse umfassen die Vasokonstriktion von glomerulären Arteriolen, die Freisetzung von vasoaktiven Substanzen und das Kontrahieren der Mesangiumzellen (Demetris et al., 1991; Shapiro et al., 1993; Nalesnik et al., 1987; Mene et al., 1989; Japanese FK-506 study Group, 1993).

Studien an Sprague-Dawley Ratten (Hammond and Kind, 1995) berichten über eine erhöhte Synthese von juxtaglomerulärem (JG) Renin-mRNA unter dem Einfluss von FK-506 oder CyA, woraus eine durch Angiotensin II vermittelte verstärkte renale Vasokonstriktion resultierte.

Es wurde gezeigt, dass eine Inkubation der Mesangiumzellen mit FK-506 zu einer Zunahme der intrazellulären Calcium-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) führte (Hadad et al., 1995). Als Folge der erhöhten intrazellulären Calcium-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) wurde eine Abnahme der Oberfläche der Mesangiumzellen gemessen, was für eine Kontraktion der Mesangiumzellen sprach. Durch das Kontrahieren der Mesangiumzellen ändert sich die Spannung der renalen Basalmembran, was zum Wechseln des Ultrafiltrationskoeffizienten führt (Barros et al. 1987).

Mehrere Gruppen berichten, dass CyA die hormonell stimulierte Ca^{2+} Mobilisierung modifizieren und die Kontraktilität wie auch die Proliferation der renalen Mesangiumzellen beeinflussen kann (Kremer et al., 1989; Pfeilschifter, 1988; Martin et al., 1988; Skorecki et al., 1992).

Während unter CyA antiproliferative Effekte beobachtet wurden, war unter der FK-506-Medikation eine verstärkte Proliferation von Mesangiumzellen und eine intensivere mesangiale Matrixproduktion und eine tubuläre Vakuolenbildung in der Niere gesehen worden (Wijnen et al., 1991; Yamaguchi, 1991; Demetris et al., 1991).

Mykophenolat Mofetil (MMF)

MMF ist seit 1996 zur immunsuppressiven Erhaltungstherapie nach Nierentransplantation und inzwischen nach Herztransplantation in Deutschland zugelassen. Das Prodrug MMF ist der Morpholino-Ethyl-Ester der Mykophenolsäure (MPA), eines Gärungsproduktes verschiedener Pilzarten der Gattung *Penicillium* (Abb. 1-7). Nach oraler Medikation wird MMF durch die Esterasen zu MPA hydrolysiert (Allison et al., 1991; Allison und Eugui, 1993).

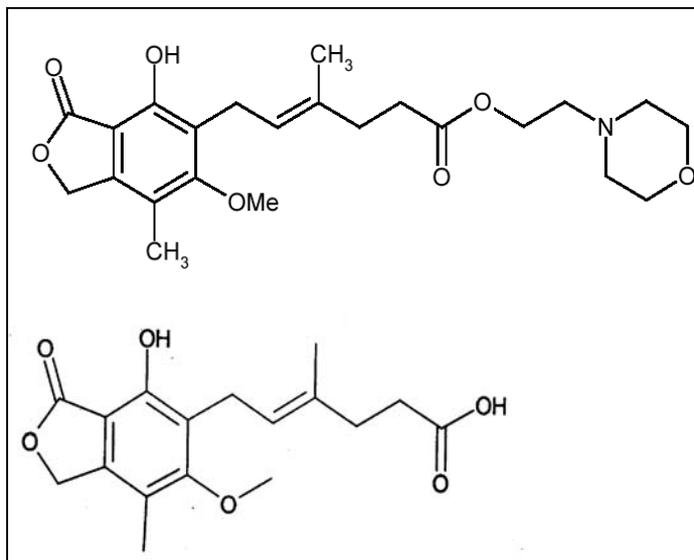


Abbildung 1-7:
Strukturformel von
Mykophenolat Mofetil (MMF, oben),
Mykophenolsäure (MPA, unten).

MPA hemmt selektiv, nicht-kompetitiv und reversibel die Inosin-Monophosphat-dehydrogenase (IMPDH) und inhibiert somit den *der novo Pathway* der Guanosinnukleotid-Synthese (Abb. 1-8). Während andere Zellen auch über den *Salvage pathway* verfügen, sind die proliferierenden Lymphozyten überwiegend auf diesen Purin-Syntheseweg angewiesen. Durch die Verminderung des Guanosinnukleotid-Pools bewirkt MPA eine Proliferationshemmung von B- und T-Lymphozyten.

Die Blockade der IMPDH unter MPA führt auch zu einer Hemmung der Glykosylierung von lymphozytären und monozytären Adhäsionsmolekülen, die für die Bindung der Lymphozyten an Endothelzellen und die Überquerung der Endothelbarriere notwendig sind (Blaheta et al., 1997). Darüber hinaus wurde über immunmodulierende Effekte der MPA berichtet, nach denen MPA auf die Immunglobulin- und Autoantikörperproduktion sowie auf die Zytokin-Synthese (IFN- und IL-10) suppressiv wirkt (Jonsson und Carlsen, 2001).

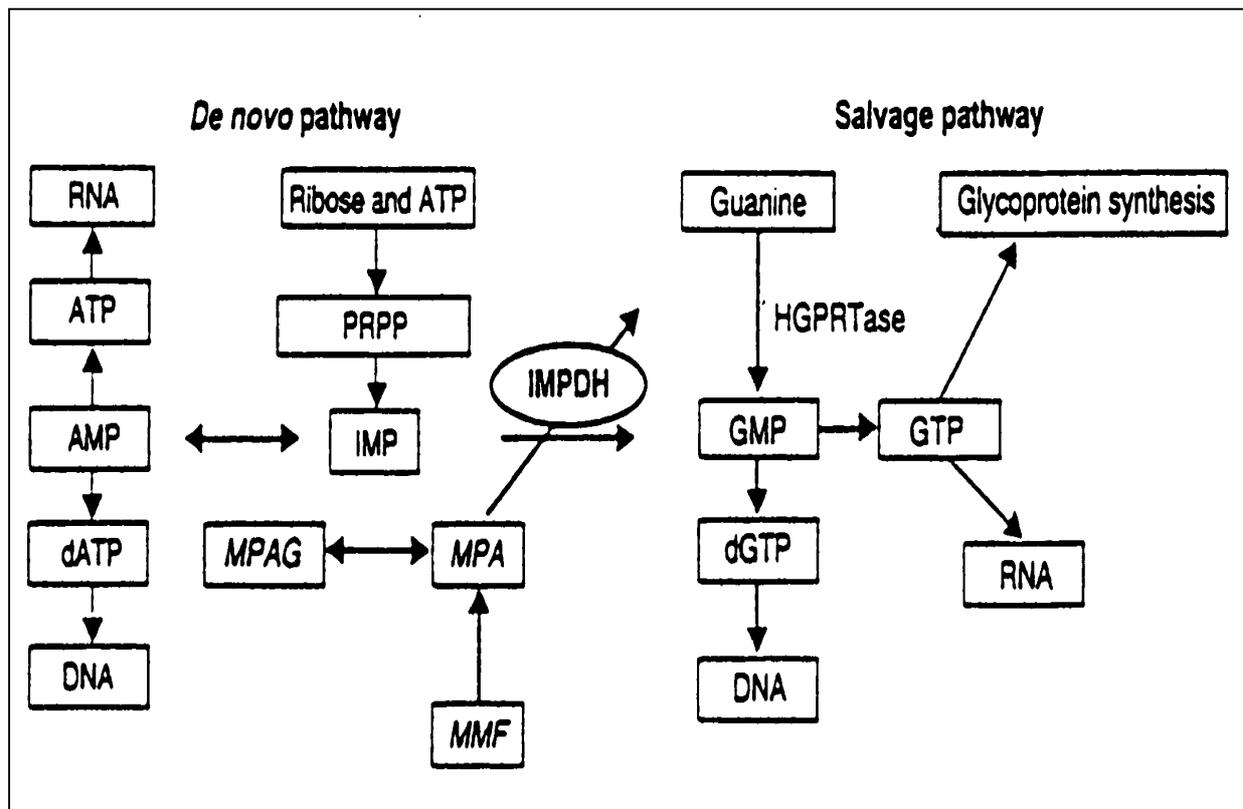


Abbildung 1-8: Inhibitorische Wirkung von Mykophenolsäure (MPA) auf die Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH).

Im Gegenteil zu CyA oder FK-506 sollen unter MPA keine nephrotoxischen Effekte beobachtet werden. Viele klinische Studien ergaben, dass die Behandlung von Patienten mit MMF nach einer Organtransplantation die renale Funktion verbessern kann (Baryalei et al., 2003; Pfitzmann et al., 2003; Ziolkowski et al., 2003). Tierexperimentelle Studien zeigten, dass eine Therapie mit MMF von Nephritis-Ratten zu einer signifikanten Verbesserung der glomerulären Histologie sowie zur Reduktion der Proteinurie führte. Es wurde eine Reduktion der glomerulären Zellularität, der Synthese von α -smooth muscle actin (SMA), der extrazellulären Matrixdeposition und der glomerulären Hypertrophie festgestellt (Ziswiler et al., 1998). In einer Arbeit von Shihab et al. (2003) konnte auch ein positiver Einfluss von MMF in einem Model einer chronischen CyA-Nephrotoxizität bewiesen werden. Dabei verbesserte MMF deutlich die Gefäßdurchgängigkeit der afferenten Arteriolen und reduzierte die TGF- β -mRNA- und -Proteinkonzentration, woraus eine verminderte Expression von ECM (extrazelluläre Matrix)-Proteinen Biglycan und Collagen I und IV

Typ resultierte. Es wird vermutet, dass die positive Beeinflussung der Niere durch MPA nicht nur auf deren immunsuppressive Effekte zurückzuführen ist.

Eine proliferationshemmende Wirkung von MPA wurde auch in nicht lymphatischen Zellen wie vaskulären Muskelzellen, Endothelzellen und Mesangiumzellen beobachtet (Mohacsi et al., 1997; Renders et al., 1997; Ziswiler et al., 1998; Hauser et al., 1999; Dubus et al., 2002). Bislang ist weniger untersucht worden, welche Wirkmechanismen dafür verantwortlich sind. Studien von Hauser et al. (1999) zeigten, dass antiproliferative Effekte von MPA auf Mesangiumzellen ähnlich wie bei Lymphozyten infolge der Verminderung des Guanosinnukleotid-Pools durch Hemmung der *de-novo* Purinsynthese auftraten. Versuchsergebnisse von Johnson und Mukku (1979) deuten daraufhin, dass die durch MPA abgesenkte GTP-Konzentration in der Niere der Ratte die Aktivierung der Adenylylcyclase reduziert. Die Adenylylcyclase katalysiert die Bildung von zyklischem AMP (cAMP), das als ein Signalmolekül bei der Aktivierung von der A-Kinase dient, die ihrerseits eine Aktivierung der Transkription spezifischer Gene bewirkt. Guanosin-5'-triphosphat (GTP) ist also an vielen metabolischen Prozessen beteiligt: DNA- und Proteinsynthese, an der Zusammenlagerung der Mikrotubuli, an der AMP-Synthese, an der G-Protein-Aktivierung, an der Proteinglykosylierung und Synthese von Tetrahydrobiopterin (Wu et al., 1994).

Zu Beginn der hier vorliegenden Arbeit waren keine Ergebnisse zur Wirkung von MPA auf die Expression von Wachstumsfaktoren oder Zytokinen bei Mesangiumzellen bekannt. Da nicht lymphatische Zellen wie die Mesangiumzellen nicht nur auf die *de novo-Purinsynthese* angewiesen sind sondern auch über *salvage pathway* verfügen, gingen wir davon aus, dass bei solchen Zellen MPA zusätzlich andere Effekte als die IMPDH-Hemmung nutzt, um hier antiproliferativ zu wirken.

1.4.2 ACE-Hemmer und AT₁-Rezeptorblocker (ARB) - Modulatoren des RAAS

Die Therapie mit ACE-Hemmern oder mit AT₁-Rezeptorblockern, die den RAAS beeinflussen (Abb. 1-9), ist eine nephroprotektive Maßnahme zur Progressionsverlangsamung der GN.

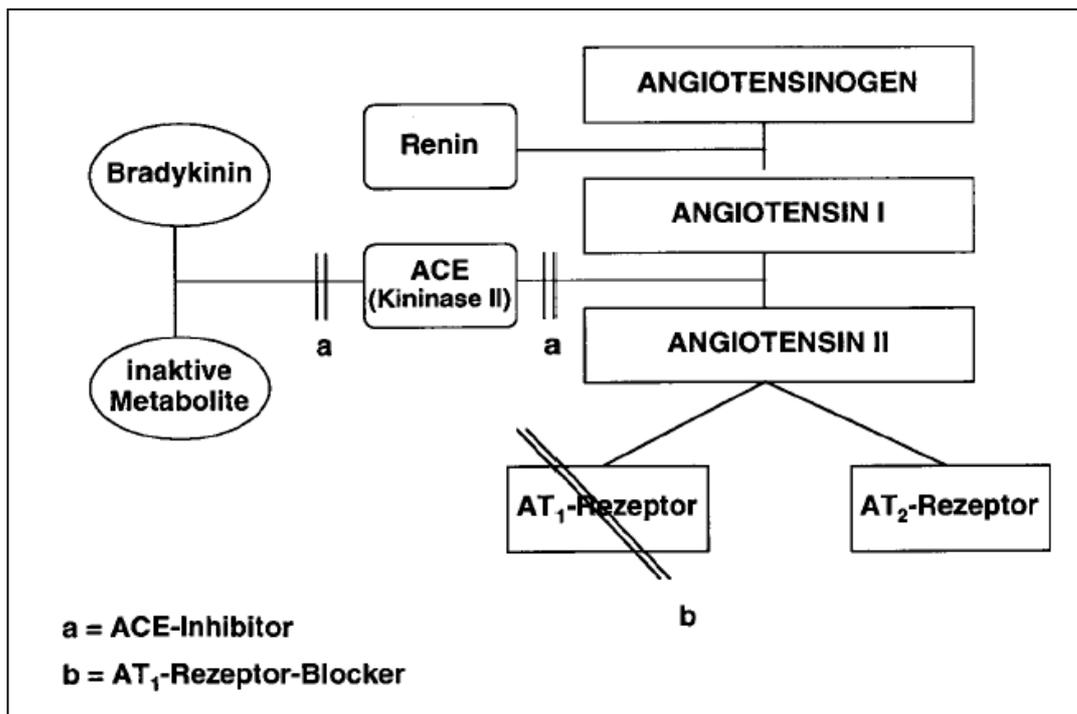


Abbildung 1-9: Das Renin-Angiotensin-System und Inhibierungswege eines ACE-Hemmers bzw. eines AT₁-Rezeptorantagonisten (Pichler und Huber, 1998)

Alle ACE-Hemmer blockieren die Umwandlung des inaktiven Ang I durch das "Angiotensin-Converting-Enzyme" (ACE) in das aktive Ang II sowie den Abbau des zirkulierenden Bradykinins. Die verminderte Bildung von Ang II sowie die Hemmung des Bradykinin-Abbaus führen zu einer vermehrten Vasodilatation. Darüber hinaus wird die Ang II-abhängige Aldosteron-Sekretion vermindert, was zu einem Anstieg der Serum-Kalium-Konzentration führt (Abb. 1-9).

Während die ACE-Hemmer in die Synthese von Ang II angreifen, blockieren die Ang II-Rezeptorantagonisten die Anbindungsstellen des vasoaktiven Peptidhormons. Die AT₁-Rezeptorantagonisten binden mit hoher Affinität an den AT₁-Rezeptor und sind mit ACE-Hemmern in ihrer antihypertensiven Wirksamkeit vergleichbar (Abb. 1-9).

Zahlreiche klinische Studien an Patienten mit renalen Erkrankungen [REIN (Ramipril Efficacy In Nephropathy) -Studie, REIN *follow up* Studie, AASK (African American Study of Kidney Disease and Hypertension) – Studie] sowie an Patienten mit hohen kardiovaskulären Risikofaktoren und Diabetes mellitus [HOPE (Heart Outcomes Prevention Evaluation)-Studie] konnten die nephroprotektive Wirkung von ACE-Hemmern belegen (Schadlich et al., 2001; The GIESEN Group, 1997; Ruggenti, 1998; Agodoa, 2001; HOPE-Investigators, 2000). Beispielsweise zeigte die „REIN“-Studie, dass durch die Therapie mit Ramipril die Proteinurie und ein Abfall der glomerulären Filtrationsrate im Vergleich zu einer Placebo-plus-konventionellen-Therapie behandelten Kontrollgruppe signifikant reduziert wurde. Ähnlich wie mit ACE-Hemmern konnte mit AT1-Rezeptorantagonisten parallel zu der antihypertensiven Wirkung auch ein positiver Einfluss auf die Proteinurie, die Niereninsuffizienz und die medikamentös bedingte Nephrotoxizität erzielt werden [Erley et al., 1995; Gansevoort et al., 1994; RENAAL (Reduction of Endpoints in Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus with **A** II **A**ntagonist **L**osartan) –Studie: Shahinfar et al., 2002; Kuhlmann und Kohler, 2002; Sun et al., 2005]. Bei Patienten mit chronischen Nierenschäden resultierte eine 6-monatige Therapie mit dem AT1-Antagonisten Valsartan in einer Verminderung der Proteinurie bei gleichbleibender GFR (Plum et al., 1998).

Alle erwähnten Studien (REIN-Studie, REIN *follow up* Studie, AASK – Studie, RENAAL-Studie, Plum et al., 1998) deuten darauf hin, dass der renoprotektive Effekt von ACE-Hemmern und AT1-Rezeptorblockern nicht nur auf ihre blutdrucksenkende Wirkung zurückzuführen ist. Der genaue zelluläre oder molekulare Wirkmechanismus der Pharmaka ist derzeit Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Ergebnisse mehrerer Arbeitsgruppen deuten darauf hin, dass durch die Blockade der Ang II-Bildung oder die Blockade der AT-1 Rezeptoren die durch Ang II induzierten intrazellulären *second-messenger*-Systeme und Enzymkaskaden effektiv gehemmt werden können (Lea et al., 2002; Inagaki et al., 2002; Muscella et al., 2003; Chen et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit sollte die Wirkung von dem ACE-Hemmer Ramipril und von dem AT1-Rezeptorblocker Valsartan an Mesangiumzellen untersucht werden.

Ramipril wird nach oraler Verabreichung im Gastrointestinaltrakt schnell und vollständig resorbiert und in der Leber durch Esterasen zu seinem aktiven Metaboliten Ramiprilat hydrolisiert (Abb. 1-10).

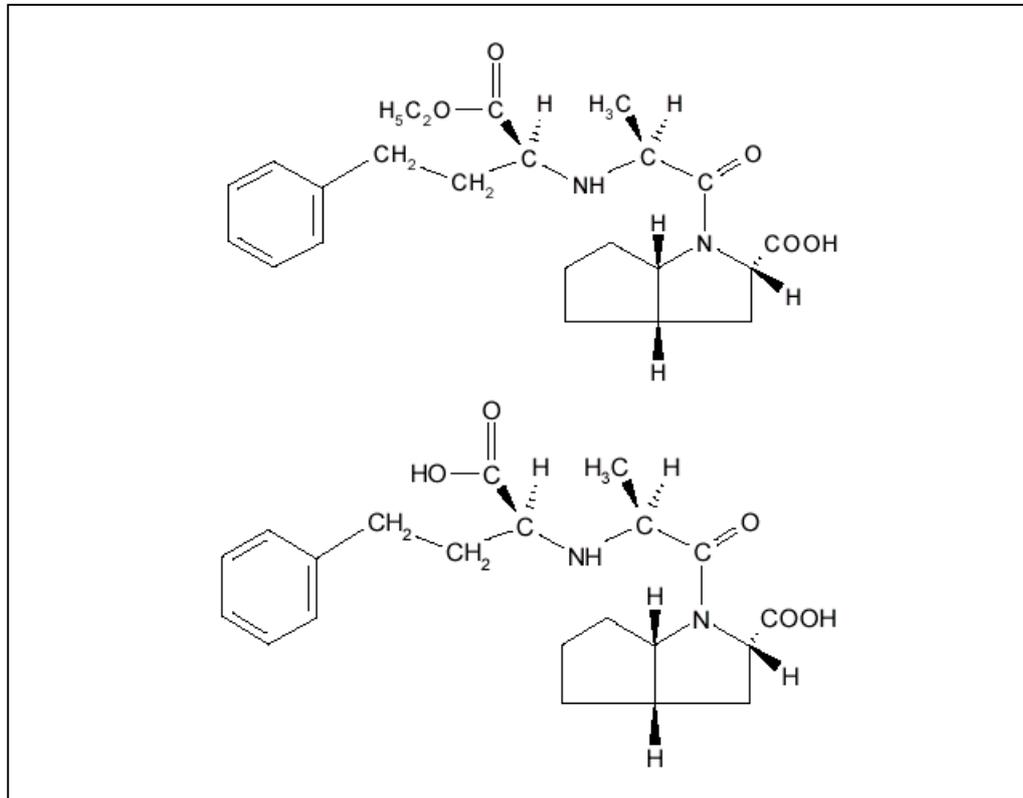


Abbildung 1-10: Strukturformel des ACE-Hemmers Ramipril (*oben*) und seines aktiven Metabolites Ramiprilat (*unten*).

Ramiprilat wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um das Vorhandensein eines lokalen RAS (Braam & Koomans, 1996; Atiyeh et al., 1995) in der Monozellkultur zu überprüfen.

Der AT1-Rezeptorantagonist Valsartan ist ein Tetrazol-Biphenyl-Valinderivat, der hoch selektiv und kompetitiv an den AT1-Rezeptor bindet (de Gasparo und Whitebread, 1995; Colussi et al., 1997; Criscione et al., 1993), (Abb. 1-11).

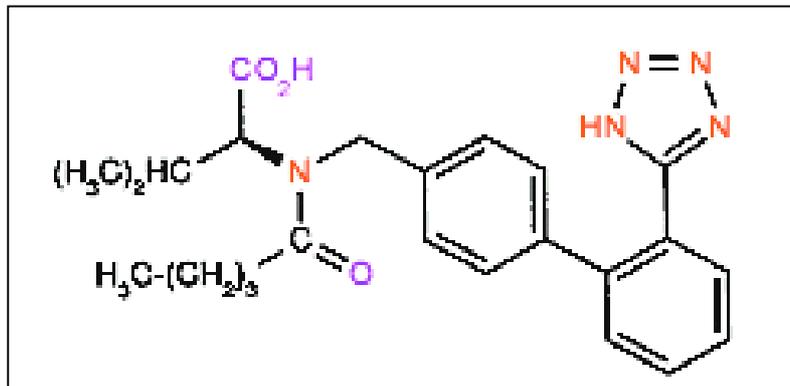


Abbildung 1-11: Strukturformel des AT1-Rezeptorantagonisten Valsartan.

1.4.3 Statine

Statine als Inhibitoren der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A (HMG-CoA)-Reduktase sind in der Therapie der Hypercholesterinämie etablierte und effektive Arzneimittel, deren Nutzen sowohl in der Primär- als auch in der Sekundärprävention der koronaren Herzkrankheit nachgewiesen wurde. Genauer gesagt besteht die cholesterinsenkende Wirkung der Statine in der Hemmung der durch HMG-CoA-Reduktase katalysierten Umwandlung von HMG-CoA zu Mevalonsäure (Abb. 1-12).

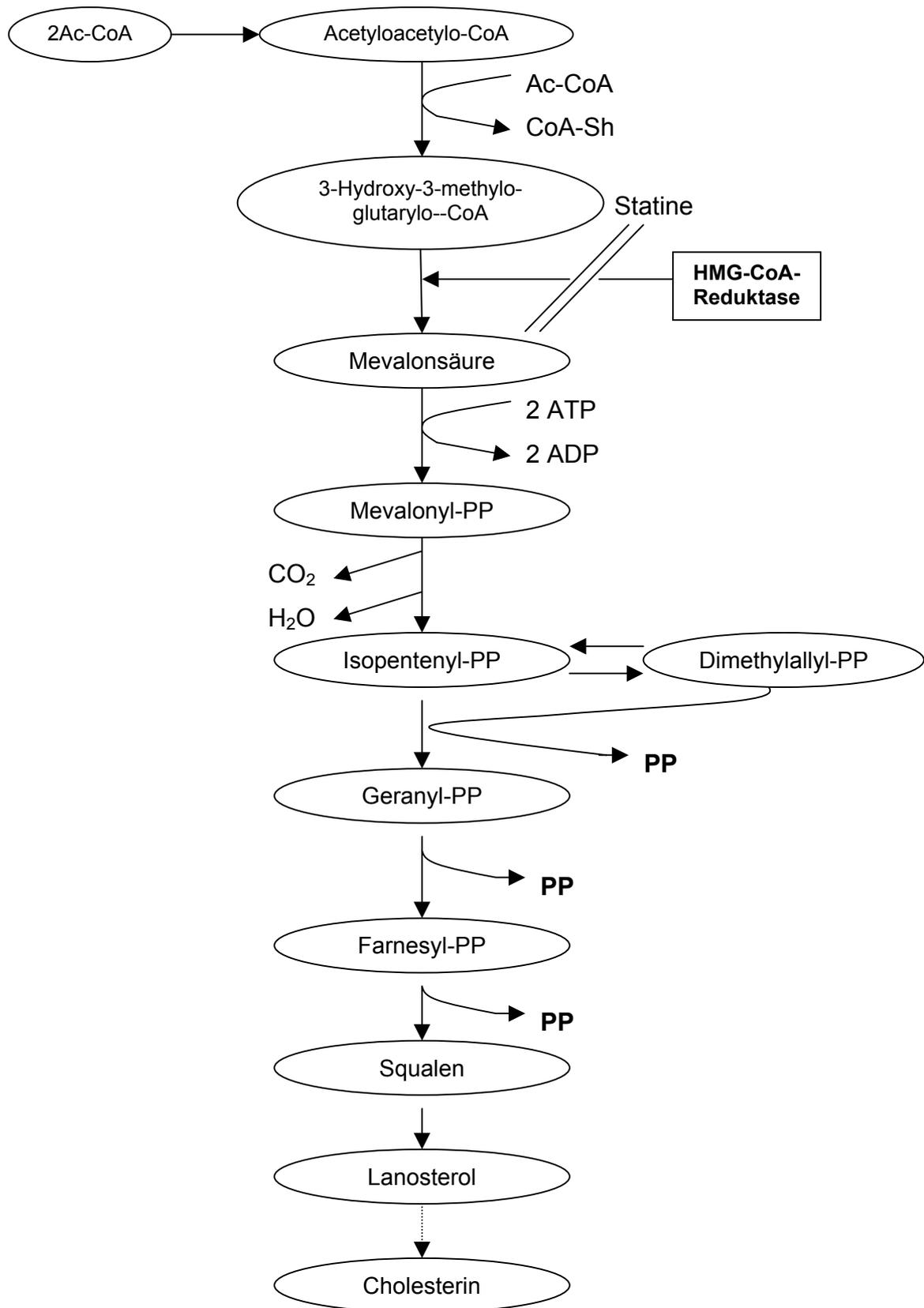


Abbildung 1-12: Das Schema der Cholesterinsynthese und Inhibierung der HMG-CoA- Reduktase durch Statine.

Befunde mehrerer Untersuchungen deuten darauf hin, dass Statine unabhängig von ihrer cholesterinsenkenden Wirkung effektiv die Nierenfunktion beeinflussen können (Guijaro und Kaene, 1996; Buemi et al., 2000; Gheith et al., 2002; Lee et al., 2002).

Die Ursache dieser durch Statine „zusätzlich“ hervorgerufenen sogenannten pleiotropen Effekte ist noch unklar und wurde zum Gegenstand vieler Untersuchungen.

Tierexperimentelle Daten und Ergebnisse der *in vitro* Studien weisen auf eine antiproliferative Wirkung von Statinen auf manche Zelltypen einschließlich Mesangiumzellen hin (Yoshimura et al., 1999; Ishikawa et al., 1995; Nogaki et al., 1999; Grandaliano et al., 1993). Eine Simvastatin-Behandlung von Ratten mit einer anti-Thy 1.1 Nephritis führte zu einer Suppression der mesangialen Zellproliferation und extrazellulären Matrixexpansion sowie zu einer Blockade der Makrophageninfiltration in die Glomeruli (Yoshimura et al., 1999). Wie diese Studie auch zeigte, korrelierte der antiproliferative Effekt von Simvastatin mit einer Reduktion von *cyclin dependent kinase* (CDK2) Expression. Wie Versuche *in vitro* von Ishikawa et al. (1995) zeigten, wurde unter Simvastatin eine Reduktion der mit AVP induzierten Calcium- und Natriummobilisation beobachtet, was durch eine Hemmung des Abbaus von Phosphatidylinositol vermittelt wurde und woraus sich eine Verminderung der MAP-Kinase - Aktivität ergab.

Viele der pleiotropen Effekte lassen sich mit der Hemmung der Synthese der Zwischenprodukte der Cholesterinbiosynthese, insbesondere der beiden Isoprenyl-derivate Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) erklären. Diese Isoprenyl-derivate dienen u. a. als Lipidanker für intrazelluläre Signaltransduktionsmoleküle wie die G-Proteine (p21ras, Rho and Rac) (Casey, 1992; Sinensky und Lutz, 1992; Jackson et al., 1997; Massy et al., 1999). Die Reduktion der Synthese von FPP und GGPP beeinträchtigt den intrazellulären Transport und die subzelluläre Lokalisation membranassoziierter Proteine. Zahlreiche *in vitro*-Befunde deuten daraufhin, dass proliferations-suppressive Effekte der Statine auf diesem Mechanismus beruhen (Guijaro et al., 1996; Ishikawa et al., 1995; Bassa et al., 1999; Vrtovsnik et al., 1997).

Darüber hinaus konnten die Statine Atorvastatin und Simvastatin die Expression der endothelialen NO-Synthase (eNOS) und die NO-Bildung in vaskulären endothelialen

Muskelzellen beeinflussen (Hernandez-Perera et al., 1998). Ähnliche Effekte wurden auch bei vaskulären glatten Muskelzellen festgestellt (Hattori et al., 2002).

Ein der wirksamsten synthetisch hergestellten spezifischen Hemmer der Cholesterinsynthese ist **Cerivastatin** (Abb. 1-13).

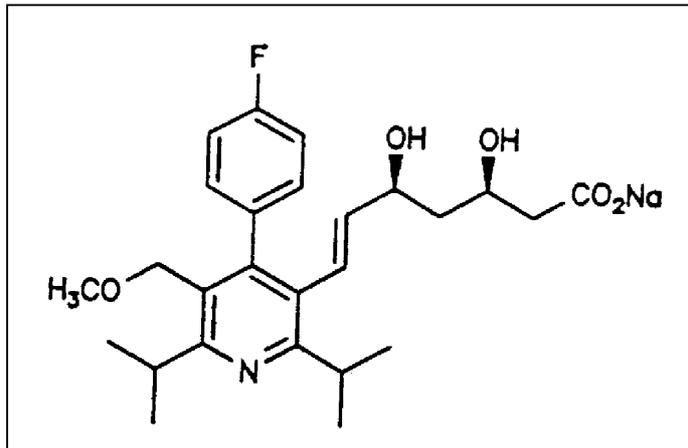


Abbildung 1-13:
Strukturformel von Cerivastatin.

Cerivastatin als Mevalonsäurederivat bindet mit sehr hohen Affinität kompetitiv an die HMG-CoA-Reduktase, was wahrscheinlich der Grund ist, dass *in vivo* niedrige Dosierungen (im Mikrogramm-Bereich) zu einer wirksamen Hemmung der Cholesterinsynthese nötig sind (Bischoff und Heller, 1998).

Wegen seltener, aber schwerwiegender Nebenwirkungen an der Muskulatur (Rhabdomyolyse) wurde es seit August 2001 von der Herstellerfirma vom Markt genommen. Es scheint jedoch, dass diese Nebenwirkung durch die gleichzeitige Einnahme des ebenfalls zur Senkung der Blutfette eingesetzten Wirkstoffs Gemfibrozil vermehrt ausgelöst wird. Da Gemfibrozil in Japan nicht im Handel ist, bleibt Cerivastatin beispielsweise in diesem Land weiterhin erhältlich.

2. Ziel der Arbeit

Viele Glomerulonephritiden (GN) weisen als charakteristisches Merkmal eine verstärkte Proliferation von Mesangiumzellen auf. Hierbei stellt die autokrine Synthese von Wachstumsfaktoren solchen wie PDGF einen wesentlichen pathogenen Faktor dar. Aber auch viele andere Faktoren, wie hoher Blutdruck, toxische, metabolische oder immunologische Einflüsse können die Pathogenese einer GN vorantreiben. In der vorliegenden Arbeit sollten verschiedene Pharmaka auf ihre Wirksamkeit an mit verschiedenen Faktoren stimulierten Mesangiumzellen untersucht werden. Dabei sollte die mesangiale Zellkultur als ein zelluläres Modell für die pathogenetischen Vorgänge bei einer Glomerulonephritis in der Niere dienen.

1. Eine Therapieoption für GN bilden derzeit moderne **Immunsuppressiva** wie CyA, FK-506 oder MMF. Dabei sollte laut vieler Berichte die antiproliferative Wirkung von CyA oder FK-506 mit toxischen Effekten verbunden sein (Demetris et al., 1991; Shapiro et al., 1993; Japanese FK-506 study Group, 1993). Ziel der vorliegenden Arbeit war zu untersuchen, ob MPA (aktiver Metabolit von MMF) im klinischen Konzentrationsbereich im Vergleich zu den bereits etablierten Immunsuppressiva CyA und FK-506 die Proliferation der Mesangiumzellen hemmen kann.

Nachdem eine zelltoxische Wirkung von MPA ausgeschlossen worden war, sollte untersucht werden, ob die inhibierende Wirkung teilweise auf der Hemmung der autokrinen PDGF-B-Synthese beruhen könnte. Bislang wurde angenommen, dass der Wirkmechanismus von MPA wie bei B- und T-Lymphozyten auch an renalen Zellen in der Hemmung der Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH) besteht (Hauser et al., 1999). Da die Purinsynthese bei nicht lymphatischen Zellen sowohl im Rahmen der *de novo*- als auch der *salvage-pathway* stattfinden kann, ist zu erwarten, dass bei MZ MPA auch via andere Signalwege als über die IMPDH-Inhibierung zu einer Proliferationshemmung beitragen könnte. Es sollte auch untersucht werden, ob die Induktion von *immediate early genes* (IEGs) c-fos und Egr-1 auf der transkriptionellen Ebene durch MPA beeinflusst werden kann.

2. Die Durchbrechung des RAAS durch **ACE-Hemmer** und **AT1-Rezeptorblocker** stellt einen wesentlichen Teil der nephroprotektiven Therapie bei der GN dar. Dabei

sind die nephroprotektiven Effekte von ACE-Hemmern oder AT1-Rezeptorblockern nicht nur hämodynamisch vermittelt (Plum et al., 1998; Schadlich et al., 2001; The GIESEN Group, 1997; Ruggenti, 1998; Agodoa, 2001; Gansevoort et al., 1994; Shahinfar et al., 2002; Kuhlmann und Kohler, 2002). Durch die Blockade der Ang II-Bildung oder Blockade der Rezeptoren werden offensichtlich die via Ang-II aktivierten Signaltransduktionswege moduliert. In der vorliegenden Arbeit sollte zuerst die These untersucht werden, ob Ang II bei Mesangiumzellen eine Hyperplasie (Zellproliferation mit einem Anstieg der Zellzahl) oder eine Zellhypertrophie (Zunahme der Zellgröße mit einem Protein-Anstieg ohne DNA- und Zellzahlzunahme) hervorruft. Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die durch Ang II ausgelösten pathologischen Veränderungen durch Ramiprilat (einen ACE-Hemmer) oder Valsartan (einen AT-1-Rezeptorblocker) aufgehoben werden können. Weiterhin sollte untersucht werden, ob die Genexpression von Egr-1, einem Transkriptionsfaktor und Regulator des Zellwachstums, unter Ang II durch die Behandlung mit einem AT1-Rezeptorblocker modifiziert wird.

3. In diesem Teil der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von **Statinen** auf die Proliferation der MZ untersucht werden. Auch bei diesen Medikamenten wurden nephroprotektive Effekte beobachtet, die unabhängig von ihrer cholesterinsenkenden Wirkung auftreten (Guijaro und Kaene, 1996; Buemi et al., 2000; Gheith et al., 2002; Lee et al., 2002). Für diese Versuche wurde Cerivastatin als einer der am effektivsten wirkenden Cholesterinsenker ausgewählt (Bischoff und Heller, 1998). Von besonderem Interesse war es zu untersuchen, ob eine mit IL-1 β ausgelöste Proliferation der Mesangiumzellen durch Cerivastatin-Behandlung aufgehoben werden kann. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob Cerivastatin analog zu anderen Statinen wie Simvastatin oder Atorvastatin, die eine modulierende Wirkung auf die eNOS-Expression und Aktivität in den vaskulären Muskelzellen zeigten (Hernandez-Perera et al., 1998), die iNOS-Expression und -Aktivität in MZ beeinflussen kann. Dabei war es wichtig zu erfassen, welche Bedeutung die NO-Bildung, deren Erhöhung bei inflammatorischen Prozessen festzustellen ist, für die Proliferation der MZ hat.

3. Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Antikörper

Anti-Actin, monoclonal	Santa Cruz Biotechnology
Anti-COX-2, monoclonal	BD Biosciences
Anti-iNOS, polyclonal	Prof.Dr. Pfeilschifter, Zentrum der Pharmakologie, Klinikum der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt (Kunz et al., 1994)
Anti-Mouse IgG, HRP-konjugiert	Santa Cruz Biotechnology
Anti-PDGF-B, polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
Anti-PDGF Rezeptor β , monoclonal	BD Biosciences
Anti-PKB α /Akt, polyclonal	Upstate Biotechnologies, USA
Anti-p-PKB/Akt, polyclonal	New England Biolabs
Anti-Rabbit IgG, HRP-konjugiert	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Tubulin, polyclonal	Santa Cruz Biotechnology

Chemikalien

Aceton	Merck, KGaA, Darmstadt
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	Gibco BRL Life Technologies GmbH
APS (Ammoniumpersulfat)	SERVA Elektrophoresis GmbH,
D-Arginin	Sigma Aldrich Chemie GmbH
L-Arginin	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Blockierungsreagenz für ELISA	Roche Diagnostics GmbH
Blockierungsreagenz für Nukleinsäure- Hybridisierung	Roche Diagnostics GmbH
Borsäure	Merck, KGaA, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma Aldrich Chemie GmbH
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Roth, Karlsruhe
DMSO	Sigma Aldrich Chemie GmbH

DNA-Molekulargewichtsmarker XIV	Roche Diagnostics GmbH
dNTP Set	Amersham Pharmacia Biotech GmbH
DTT	Sigma Aldrich Chemie GmbH
EDTA	Sigma Aldrich Chemie GmbH
EGTA	AppliChem, Darmstadt
Eisessig	Merck, KGaA, Darmstadt
Entwickler & Fixierlösung	Kodak, USA
Ethanol	Merck, KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Full Range Rainbow (Recombinant protein molecular weight markers)	Amersham Life Science
Formaldehyd	Merck, KGaA, Darmstadt
Formamid	Merck, KGaA, Darmstadt
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Glycerin	Merck, KGaA, Darmstadt
Griess Reagenz	Merck, KGaA, Darmstadt
HEPES	Biochrom AG, Berlin
IGEPAL-CA 630	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Kaliumchlorid (KCL)	Merck, KGaA, Darmstadt
L-NMMA	Alexis Biochemicals
L-NIL	Alexis Biochemicals
Magnesiumchlorid (MgCL ₂)	Merck, KGaA, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Merck, KGaA, Darmstadt
Methanol	Merck, KGaA, Darmstadt
MOPS	Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCL)	Merck, KGaA, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, KGaA, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, KGaA, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, KGaA, Darmstadt
Natriumnitrit (NaNO ₂)	Merck, KGaA, Darmstadt
Rinderserumalbumin (BSA)	Roth GmbH, Karlsruhe

Rinderserumalbumin (BSA) für Zellkultur	Sigma Aldrich Chemie GmbH
RNase/ DNase-Free Rinderserumalbumin (BSA)	Pharmacia Biotech
Salzsäure (HCL)	Merck, KGaA, Darmstadt
SDS	Merck, KGaA, Darmstadt
TEMED	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Pharmacia Biotech
Triton X-100	Fluka Feinchemikalien GmbH
Trypan blau 0,5%	Biochrom KG, Berlin
Tween 20	Merck, KGaA, Darmstadt

Alle weiteren Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Fluka (Neu Ulm), Sigma (München) in p.A. Qualität bezogen.

Zytokine und Peptide

Angiotensin II	Sigma Aldrich Chemie GmbH
IL-1 β	Cell Concepts, Roche
PDGF-BB	Cell Concepts, Roche

Enzyme, Inhibitoren, Proteasehemmer

M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/ μ l)	Invitrogen Life Technologies
RNase freie DNase I (10 U/ μ l)	Amersham Pharmacia Biotech GmbH
Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor 40 U/ μ l	Promega
Aprotinin	Roche Molecular Biochemicals
Leupeptin	Roche Molecular Biochemicals
Pepstatin	Roche Molecular Biochemicals
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Roche Molecular Biochemicals

Kit-Systeme

Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH
Cell Proliferation ELISA (BrdU)	Roche Diagnostics GmbH
Cell Proliferation Kit (MTT)	Roche Diagnostics GmbH
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche Diagnostics GmbH
ECL-Western blotting analysis system	Amersham Pharmacia Biotech GmbH
EMSA-Kit	Promega GmbH
HotStarTaq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden

Medien, Reagenzien für Zellkultur und Puffer

DMEM mit Glutamax-I, 4,5 g/L Glukose und Phenolrot	Gibco Life Technologies GmbH
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco Life Technologies GmbH
Insulin	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Penicillin / Streptomycin - Lösung	Gibco Life Technologies GmbH
Phosphat-gepufferte Saline (PBS) ohne Ca ²⁺ , ohne Mg ²⁺	Biochrom KG, Berlin
Rinderserumalbumin (BSA) für Zellkultur	Sigma Aldrich Chemie GmbH
RPMI 1640 mit Glutamax-I, 25 mM HEPES und Phenolrot	Gibco Life Technologies GmbH
Trypsin/EDTA (0,05% Trypsin/ 0,2% EDTA) mit Phenolrot	Gibco Life Technologies GmbH

Pharmaka

Cerivastatin	Bayer AG
Celecoxib	Searle, Nürnberg
Cyclosporin A (CyA)	Novartis Pharma GmbH
FK-506 (Tacrolimus)	Fujisawa GmbH
Indomethacin	Luitpold Pharma, Eschwege
MPA (Mykophenolsäure)	Roche AG
Ramiprilat	Aventis Pharma GmbH
Valsartan	Novartis Pharma GmbH

Primer

Primer (sense und antisense) für c-fos,
Egr-1, PDGF-B und GAPDH

Interactiva

Randomprimer (pd(N)₆)

Amersham Pharmacia Biotech GmbH

Radioisotope

γ -³²P-dATP (10 mCi/ml)

Amersham Pharmacia Biotech GmbH

α -³²P-dCTP (10 mCi/ml)

Amersham Pharmacia Biotech GmbH

Verbrauchsmaterial

Autoradiographie-Film

Amersham Pharmacia Biotech GmbH

Detektor-Folie

Amersham Pharmacia Biotech GmbH

Blot Absorbent Filter Paper

Bio-Rad

Immobilon-P Transfer Membrane (PVDF)

MILLIPORE

Nylonmembran Hybond N

Roche Molecular Biochemicals

Röntgen-Film

Kodak, USA

Whatmann-Chromatography-Paper

Whatmann

Das Verbrauchsmaterial wie Zellkulturflaschen, Zellkulturplatten, Pipetten, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße und andere wurde steril verpackt geliefert bzw. vor der Verwendung sterilisiert und von den Firmen Bio-Rad, Bio-Labs, Biozym, Eppendorf und Greiner bezogen.

3.2 Zellkultur

Mesangiumzellen der Ratte wurden mir freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Pfeilschifter, Zentrum der Pharmakologie, Klinikum der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt überlassen (Pfeilschifter und Vosbeck, 1991). Alle Experimente wurden mit Zellen der Passage 10 - 20 durchgeführt.

3.2.1 Kulturmedium und Zusätze

Kultivierungsmedium (Endkonzentrationen):

- RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) mit Glutamax -I, 25 mM HEPES und Phenolrot
- 10% Fetales Kälberserum, hitzeinaktiviert 30 min bei 56°C
- Penicillin-Streptomycin-Lösung 100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin
- 5 µg/ml Insulin

3.2.2 Kultivierung der Zellen

Die Kultivierung der Zellen fand entweder in 75 cm² oder in 175 cm² Zellkulturflaschen in 15 - 30 ml Nährmedium in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C, 5%-iger CO₂-Gehalt und 95%-iger konstanter Luftfeuchtigkeit statt. Im Abstand von drei Tagen wurde das verbrauchte Medium mit einer sterilen Pipette gegen frisches Medium gewechselt. Die Intervalle der Subkultivierung waren abhängig von der jeweiligen Proliferationsgeschwindigkeit der Zellen.

3.2.3 Passagieren der Zellen

Waren die Zellen bis zur 80-90% Konfluenz gewachsen, wurde eine Subkultivierung (Passagieren) vorgenommen, da ansonsten kein Wachstum als Monolayer gewährleistet war. Dafür wurde das alte Medium entfernt, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und durch 5-minütige Inkubation mit 2,5 - 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C vom Flaschenboden abgelöst. Durch Zugabe des doppelten Volumens an frischem Medium mit FCS wurde Trypsin inaktiviert. Die Zellsuspension wurde in

einem sterilen Röhrchen 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Zur weiteren Kultivierung wurden die Zellen nach einem Verdünnungsfaktor 1:3 bis 1:5 in neue Kulturflaschen ausgesät.

Verwendete Lösungen:

- Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% Trypsin/0,02% EDTA, 37°C)
- PBS ohne Ca^{2+} / Mg^{2+}
- Nährmedium mit 10% FCS

3.2.4 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen kryokonserviert. Hierzu wurden die Zellen, wie in 3.2.3 beschrieben, durch Behandlung mit Trypsin/EDTA abgelöst und abzentrifugiert. Zellpellet einer 75 cm² Flasche wurde in 1,5 ml FCS resuspendiert und auf 3 Kryoröhrchen je 500 µl verteilt. Nach dem Abkühlen im Eiswasser wurden dem Zellpellet 500 µl 20% DMSO in FCS tropfenweise zugegeben (Endkonzentration: 10% DMSO in FCS). Anschließend wurden die Zellen 30 min auf dem Eis stehengelassen und zuerst bei -80°C eingefroren. Nach 24 h wurden die Zellen in Flüssigstickstoffbehälter überführt.

Das Auftauen der im Flüssigstickstoff gelagerten Zellen erfolgte, indem die Gefäße bei 37°C inkubiert wurden, bis die Zellsuspension vollständig aufgetaut war. Die Zellsuspension wurde vorsichtig in ein steriles Röhrchen mit 5 ml temperiertem Medium überführt und die Zellen wurden abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde erneut im 5 ml Medium aufgenommen und die Zellen wurden in die Kultivierungsflaschen ausgesät. Die weitere Kultivierung wie bei 3.2.2 und 3.2.3.

3.2.5 Stimulationsexperiment und Behandlung mit Medikamenten

3.2.5.1 Stimulationsmedium

Die Stimulationsexperimente wurden im DMEM (Dulbeccos modifiziertes Eagles Medium) mit Glutamax-I, 4,5 g/L Glucose und Phenolrot durchgeführt. Zusätzliche Bestandteile:

- 0,1% BSA
- 0 - 0,5% FCS
- Penicillin-Streptomycin-Lösung (100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin)
- 5 µg/ml Insulin*

** Bei Experimenten, wo eine Stimulation mit Angiotensin II erfolgte, wurde gezielt auf die Zugabe von Insulin verzichtet, da nach manchen Literaturangaben das Risiko einer gegenseitigen Wirkung zwischen Angiotensin II und Insulin bestehen könnte (Solow et al., 1999; Velloso et al., 1996; Folli et al., 1997). Unsere Vorversuche mit MTT-Test haben dies auch bestätigt.*

Als proliferationsfördernde Substanzen wurden dem Stimulationsmedium abhängig vom jeweiligem Experiment zugefügt:

- 10% FCS
- 10 ng/ ml - 25 ng/ml PDGF-BB
- 0,5 nM, 1 nM, 2 nM IL-1β
- 0,1; 1; 10 µM Angiotensin II

Das Zytokin IL-1β und PDGF-BB wurden sofort nach Erhalt zu einer Konzentration 10 µg/ml im PBS mit 0,1% BSA gelöst und in Aliquots bei -20°C gelagert. Angiotensin II wurde als Stammlösung in PBS mit 0,1% BSA zu einer Konzentration 10 mM gelöst und in Aliquots bei -20°C gelagert.

3.2.5.2 Stammlösungen der Medikamente

Tabelle 3-1: Auflistung der untersuchten Medikamente

Medikamententyp	Medikament	Stamm- lösung	Lösungsmittel	Untersucht im Bereich
Immunsuppressivum	Cyclosporin A	10 mM	DMSO	0,019 - 10 μ M
Immunsuppressivum	FK-506	10 mM	DMSO	0,019 - 10 μ M
Immunsuppressivum	MPA	100 mM	DMSO	0,019 - 10 μ M
ACE-Hemmer	Ramiprilat	20 mM	0,1 N NaOH	0,02 - 20 μ M
AT1-Rezeptorantagonist	Valsartan	10 mM	Ethanol	0,01 - 10 μ M
Statin	Cerivastatin	10 mM	Steriles H ₂ O _{dest.}	0,005 - 5 μ M
COX-2-Hemmer	Celecoxib	15 mM	DMSO	2,5 - 10 μ M
Unselektiver Cyclooxygenasehemmer	Indomethacin*	2,8 mM	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ *	10 - 100 μ M

* Indomethacin wurde immer vor einem bestimmten Experiment frisch als 2,8 mM Stammlösung vorbereitet. Hierzu wurden 5 mg Indomethacin in 810 μ l 0,5 M Na₂HPO₄ vollständig gelöst, danach wurden 190 μ l 0,5 M NaH₂PO₄ zugegeben und mit 4 ml sterilem H₂O_{dest.} gemischt.

Bei Experimenten mit im DMSO oder in Ethanol oder in 0,1N NaOH gelösten Medikamenten wurde die Konzentrationsreihe auch im Lösungsmittel vorbereitet, so dass immer das gleiche Volumen (1:1000 oder 1:2000) zu dem Medium zugegeben wurde. Damit wurde gewährleistet, dass alle Zellen den gleichen Testbedingungen ausgesetzt waren, und dass gemessene Effekte wirklich nur auf die unterschiedliche Medikamentenwirkung zurückzuführen waren.

3.2.5.3 Aufbau der Experimente

Zur Inkubation von Mesangiumzellen mit Wachstumsfaktoren und Medikamenten wurden diese für die verschiedenen Versuchsreihen auf unterschiedliche Art und Weise kultiviert:

- In Mikrotiterplatten (MTP): Für BrdU-Test wurden $2,5 - 5 \times 10^3$ Zellen, für MTT-Test $5 \times 10^3 - 1 \times 10^4$ Zellen und LDH-Test $1 - 2 \times 10^4$ Zellen (in 100 μ l) pro Loch ausgesät.
- In 6-Loch Platten: Für mikroskopische Versuche und Genexpressionskinetiken (mittels PCR) wurden $2,5 - 5 \times 10^5$ Zellen (in 2 ml) pro Loch ausgesät.
- In Petrischalen (10 cm \varnothing): Für Proteinanalyse, Genexpression (Northern Blot) wurden 1×10^6 Zellen (in 10 ml) und für Untersuchung der Hypertrophie 5×10^5 Zellen pro Schale ausgesät.

Die Zellen wurden in entsprechender Konzentration in FCS-haltigem Medium ausgesät. Nach ca. 24 - 72 h (die Zeit hing von der Konfluenz ab) wurden die Zellen mit PBS gewaschen und das Kulturmedium wurde gegen das FCS-freie oder mit reduziertem FCS-Gehalt (0,25 - 0,5% FCS) versehene Stimulationsmedium gewechselt. Der Entzug von FCS, das verschiedene Wachstumsfaktoren beinhaltet, sollte einen Arrest der Zellen bewirken. Die Zellsynchronisation wurde über einen Zeitraum von 24 h bis 72 h durchgeführt. Danach wurde das Medium entnommen, und die Zellen wurden mit Medikamenten im Stimulationsmedium ca. 1 h vorinkubiert. Anschließend folgte die Zugabe von Stimulantien.

Die Dauer der Stimulation und der medikamentösen Behandlung der Zellen war bei den verschiedenen Experimenten unterschiedlich:

- Die Proliferationsuntersuchung mittels BrdU, MTT und Trypanblau-Test wurde nach 48 h - 120 h Inkubation durchgeführt.
- Für den LDH-Test wurden die Zellen mit untersuchten Substanzen 24 h - 72 h inkubiert.
- RNA aus den Zellen wurde nach 30 min, 1, 2, 4, 8, 12, 24 h isoliert.
- Die Proteinisolierung aus den mit MPA oder Cerivastatin behandelten Zellen erfolgte nach 24 h.
- Die Zellzahlbestimmung und die Proteinisolierung aus den mit ANG II und Valsartan oder Ramiprilat behandelten Zellen erfolgten nach 4 und nach 7 Tagen.

- Die Kernproteine aus den mit PDGF-BB und IS behandelten Zellen wurden nach 1 h und 2 h isoliert.

Bei den Zeitkinetiken, die länger als 3 Tage dauerten, wurde das Medium mit den jeweiligen Stimulantien und Medikamenten alle 72 h erneuert.

3.3 Untersuchung der Zellproliferation

Das Proliferationsverhalten von Mesangiumzellen wurde anhand folgender Verfahren untersucht:

- Zellzahlbestimmung mit Trypanblaufärbung (Trypanblau-Test)
- Bromodesoxyuridin (BrdU)-Assay
- Mitochondrialer Tetrazolium Test (MTT-Test)

Für die Feststellung, ob untersuchte Pharmaka eine toxische Wirkung auf die Mesangiumzellen aufweisen, wurde der Laktat-Dehydrogenase (LDH)-Test durchgeführt.

3.3.1 Zellzahlbestimmung mittels Hämocytometer im Trypanblau-Test

Die Bestimmung der vitalen Zellen einer Zellsuspension erfolgte durch Auszählen der Zellen, die vorher mit Trypanblau für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden, in einer Neubauer-Zählkammer. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der als Anion sehr leicht an Proteine binden kann und das Zytoplasma toter Zellen anfärben kann. Die Plasmamembran lebender Zellen kann dieser Farbstoff nicht durchqueren, diese bleiben ungefärbt.

Anhand des Trypanblau-Testes ließen sich ermitteln:

$$\text{Zellzahl / ml} = \frac{\text{Anzahl vitaler Zellen}}{\text{Anzahl der Großquadrate}} \times \text{Verdünnung} \times 10^4$$

$$\% \text{ lebende Zellen} = \frac{\text{Ungefärbte Zellen}}{\text{ungefärbte Zellen} + \text{gefärbte Zellen}} \times 100$$

$$\% \text{ Wachstum} = \frac{\text{Zellzahl}_{\text{behandelte Probe}} - \text{Zellzahl}_{\text{Kontrolle 0}}}{\text{Zellzahl}_{\text{Wachstumskontrolle}} - \text{Zellzahl}_{\text{Kontrolle 0}}} \times 100$$

Kontrolle 0: unbehandelte Zellen nach der Zellzahlsynchronisierung zum Zeitpunkt 0 (Start der Stimulation)

Wachstumskontrolle: Zellen, die über eine bestimmte Zeit mit einem Stimulus inkubiert wurden, galt als 100%

Behandelte Probe: Zellen, die mit Pharmaka vorbehandelt wurden und danach über eine bestimmte Zeit mit jeweiligem Stimulus inkubiert wurden

Die Abnahme des Wachstums unter dem Einfluss von IS ist nicht auf die Wirkung von Lösungsmittel 0,1% DMSO zurückzuführen. Die in der Abbildung 3-1 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die durch FCS induzierte starke Zellzahlzunahme und auch die Zellzahl der unstimulierten Kontrolle sich durch 0,1% DMSO nicht signifikant beeinflussen ließen.

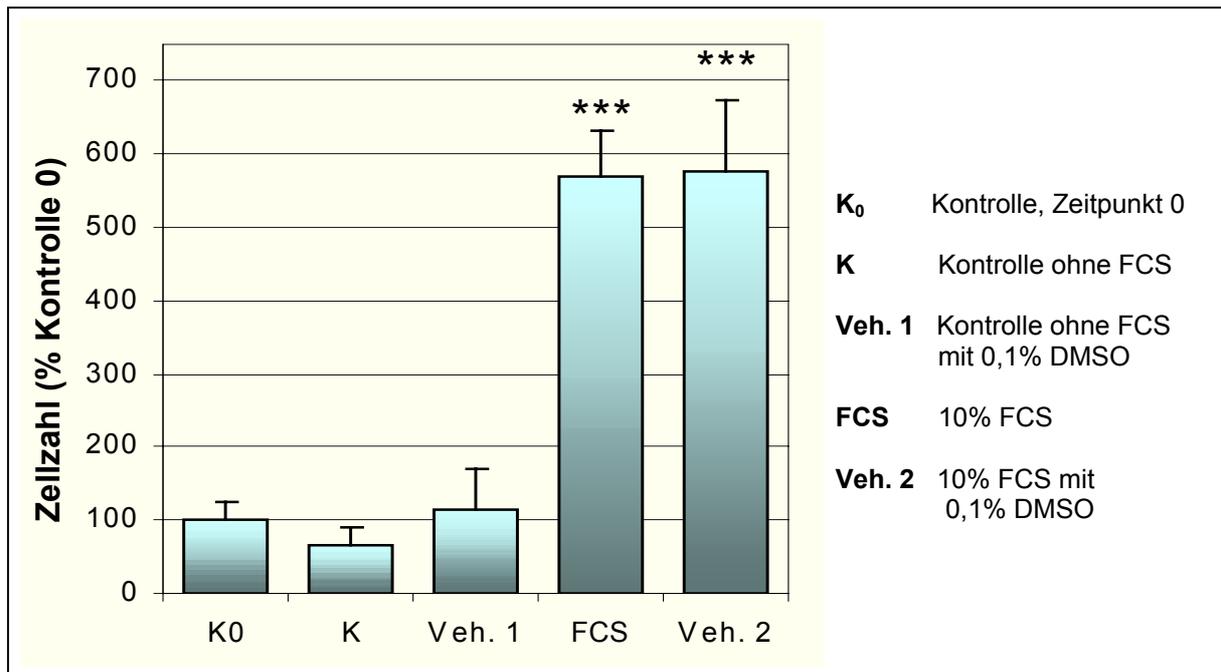


Abbildung 3-1: Zellzahlbestimmung nach Stimulation mit 10% FCS mit und ohne DMSO. Die Mesangiumzellen wurden durch Serumentzug wachstumsarretiert (72 h). Zum Zeitpunkt 0 (Kontrolle 0) und nach 48 h Inkubation wurde die Zellzahl im Trypanblau-Test ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchsansätzen, von jeweils 3 Experimenten \pm SD als % Kontrolle 0. *** $P \leq 0,001$ vs. Kontrolle 0.

Es wurde beobachtet, dass die Zellsynchronisation durch 72 h dauernden Serumentzug einen Effekt auf die Vitalität der Zellen haben kann. Die absolute Zellzahl der nicht stimulierten Kontrolle ohne Vehikel nach 48 h im Vergleich zu Kontrolle 0 (nach Zellzahlsynchronisierung- Zeitpunkt 0) nahm ab. Deshalb wurde die Zellsynchronisierung für weitere Versuche, bei denen die Zellen mit einzelnen Agonisten stimuliert wurden, unter Zusatz von 0,25 - 0,5% FCS im Medium und die Stimulation mit 0,25 - 1% FCS im Medium durchgeführt.

3.3.2 BrdU-Assay

Dieser Test beruht auf dem Einbau von 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU) anstelle von Thymidin in die DNA proliferierender Zellen innerhalb eines bestimmten Zeitraums und nach entsprechender, dem Versuch angemessener Vorbehandlung der Zellen. Nach der Entfernung des Mediums und 30 min dauernder Fixierung mit 200 µl Fix-DeNat folgte eine 30 minütige Inkubation mit Blockierungsreagenz. Danach fand eine Inkubation mit jeweils 100 µl anti-BrdU-POD-Antikörper für 30 - 90 min bei Raumtemperatur statt. Anschließend wurden die Proben 3 x mit Waschlösung gespült und jeweils 100 µl Substratlösung zugegeben. Durch Zugabe von 25 µl 1 M H₂SO₄ wurde die enzymatische Reaktion gestoppt und das Reaktionsprodukt konnte anhand der wellenlängentypischen Absorption im ELISA-Reader quantifiziert werden. Die Absorptionswerte, gemessen bei Wellenlänge 450 - 690 nm, korrelieren direkt mit der DNA-Synthese proliferierender Zellen.

3.3.3 MTT-Test

Mit Hilfe dieses Testes, erstbeschrieben von Mosmann (1983), kann die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen gemessen werden, unabhängig davon, ob sie momentan DNA synthetisieren oder nicht. Das schwach gelbe 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium Bromid (MTT) dringt in die Zellen ein, sein Tetrazoliumring wird durch Dehydrogenasen aktiver Mitochondrien aufgebrochen und so entstehen alkohollösliche, purpurrote Formazankristalle (Abb. 3-2). Diese werden durch SDS, das die Zellen lysiert, solubilisiert und die Intensität der purpurroten Formazanlösung kann photometrisch bestimmt werden. Die Absorptionswerte korrelieren direkt mit der Zellzahl vitaler Zellen.

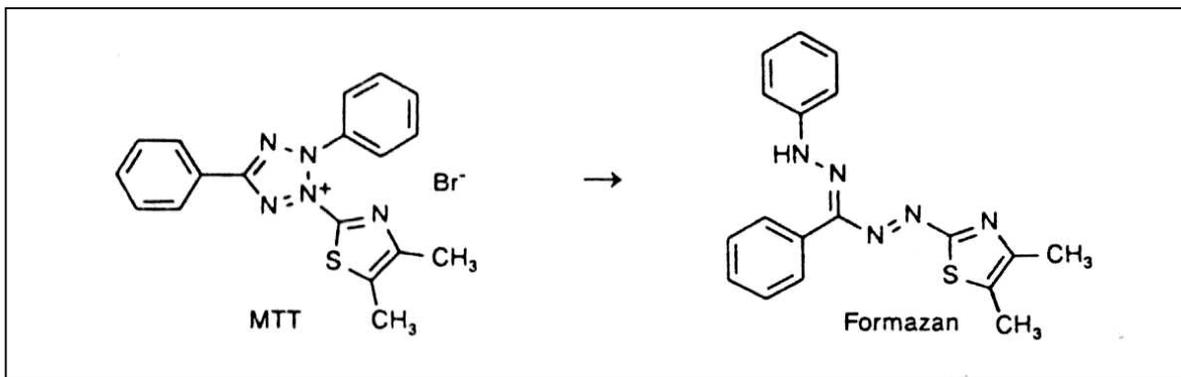


Abbildung 3-2: Metabolisierung von MTT zu Formazan-Salz bei vitalen Zellen.

Für die Durchführung von MTT-Test wurden den Zellen (in MTP gewachsen) nach einer bestimmten Inkubation mit untersuchten Substanzen jeweils 10 µl MTT-Reagenz (Endkonzentration 0,5 mg/ml) zugegeben. Die Zellen wurden 4 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach folgte eine weitere Inkubation mit Solubilisierungslösung (10% w/v SDS in 0,01 M HCL) über Nacht bei 37°C. Anschließend, nachdem die Formazankristalle gelöst worden waren (mikroskopische Kontrolle), wurde die Absorption bei 550 - 690 nm im ELISA-Reader gemessen.

3.3.4 LDH -Test zur Bestimmung von Zytotoxizität

Dieser Test beruht auf der Freisetzung von Lactatdehydrogenasen in das Medium nach der Schädigung der Plasmamembran der Zellen. Hierzu werden die zellulären Überstände mit Reaktionsmischung inkubiert. Die LDH-Aktivität wird enzymatisch bestimmt. Die Reaktion verläuft in zwei Schritten (Abb. 3-3): Im ersten Schritt wird NAD⁺ zu NADH/H⁺ reduziert durch LDH-katalysierte Konversion von Lactat zu Pyruvat. Im zweiten Schritt transferiert Katalyst (Diaphorase) H/H⁺ von NADH/H⁺ auf 2-[4-Iodophenyl]-3-[4-Nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid (INT Tetrazoliumsalz), das zu Formazan reduziert wird. Es resultiert eine rötliche Flüssigkeit, deren Färbungsgrad mit der LDH-Aktivität korreliert.

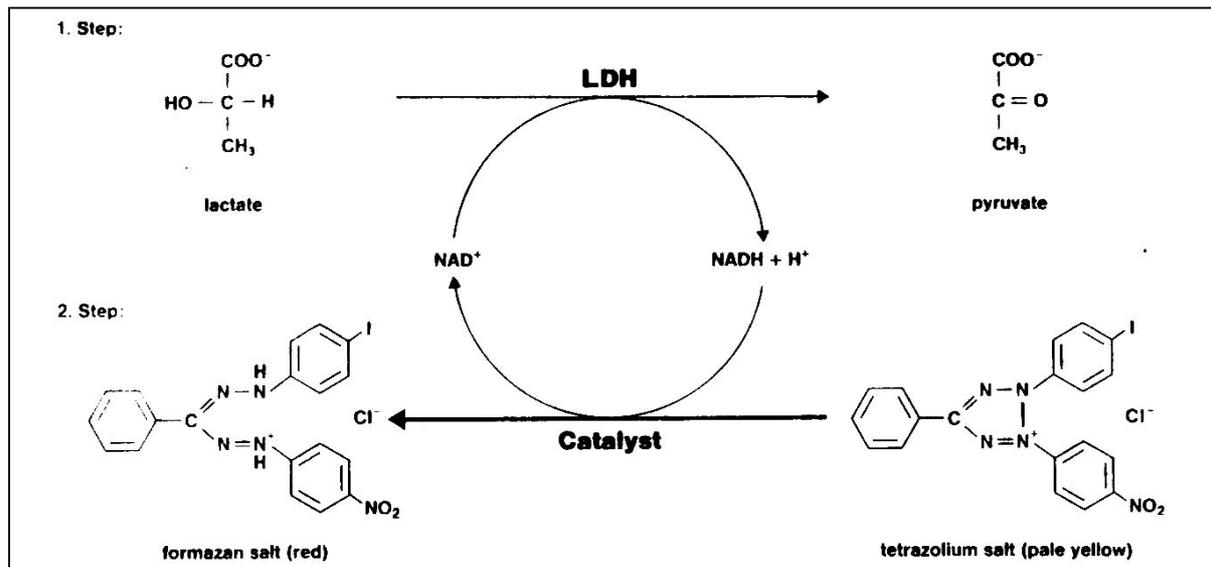


Abbildung 3-3: Enzymatische Bestimmung von LDH. Die Reaktion verläuft in zwei Schritten: Schritt 1: Die freigesetzte LDH reduziert NAD⁺ zu NADH/H⁺ durch Oxidation von Lactat zu Pyruvat. Schritt 2: Catalyst transportiert 2H von NADH/H⁺ auf das gelbe INT Tetrazoliumsals, das zum roten Formazansals reduziert wird.

Für die Durchführung des LDH-Tests wurden die MTP mit darin gewachsenen Zellen nach einer bestimmten Inkubationszeit mit Testsubstanzen 10 min bei 1200 rpm abzentrifugiert und 100 µl vom zellulären Überstand in neue MTP überführt. Die Reaktionsmischung wurde kurz vor dem Test vorbereitet. Dazu wurden 250 µl von Lösung 1 (mit Catalyst) mit 11,25 ml Lösung 2 (INT-Farbstoff) gemischt. Danach wurden jeweils 100 µl von der Reaktionsmischung zugegeben und die MTP bis 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 495 nm gemessen und die % Toxizität nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Toxizität (\%)} = \frac{\text{OD}_{\text{Probe}} - \text{OD}_{\text{Kontrolle Minimum}}}{\text{OD}_{\text{Kontrolle Maximum}} - \text{OD}_{\text{Kontrolle Minimum}}} \times 100$$

OD_{Probe} - Absorptionswert von mit Medikament behandelten Proben

OD_{Kontrolle Minimum} - Absorptionswert von nicht behandelten Proben (ohne Pharmaka)

OD_{Kontrolle Maximum} - Absorptionswert von Proben, die mit 1% (v/v) Triton X-100 behandelt wurden, galt als 100% toxisch

Zusätzlich wurden Kontrollen nur für Pharmaka (ohne Zellen) durchgeführt, um eine eventuelle LDH-Aktivität der Pharmaka auszuschließen.

3.4 Untersuchung der Hypertrophie

Die Hypertrophie wird definiert als Vergrößerung eines Gewebes oder Organs durch die Vergrößerung des Volumens der einzelnen Zellen. In dieser Arbeit wurde die Hypertrophie anhand der Proteinmenge im Vergleich zu Zellzahl quantifiziert.

Nach einer bestimmten Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsinisiert und abzentrifugiert (3.2.3). Danach wurde das Zellpellet in 0,5 ml PBS resuspendiert und 10 µl für die Zellzahlbestimmung (3.3.1) genommen. Die Zellsuspension wurde erneut 5 min bei 1000 rpm abzentrifugiert und anschließend in 100 µl eiskaltem Lysispuffer solubilisiert. Die Proben wurden weiter wie in 3.8.1 beschrieben bearbeitet und die Proteinkonzentration wie in 3.8.2 beschrieben ermittelt. Anschließend wurde das Verhältnis berechnet:

$$\frac{\text{Gesamtprotein / Platte}}{\text{Zellzahl / Platte}} = \text{Protein / Zelle [ng/Zelle]}$$

3.5 Quantifizierung der NO-Produktion

Das durch NO-Synthase erzeugte NO diffundiert leicht aus den Zellen heraus und wird innerhalb von ca. 4 sec in wässrigen und biologischen Lösungen zu Nitrit (NO₂) und Nitrat (NO₃) oxidiert. Da die Mengenverhältnisse beider Produkte variieren, wird als Index für produziertes NO der Nitritgehalt nach Umsetzung des endogenen Nitrates durch die Nitratreduktase bestimmt.

Für die Untersuchung von NO-Produktion wurde ein „Ready to go“- Test mit Griess Reagenz (Merck) verwendet. Die Reaktion verläuft in drei Schritten (Abb. 3-4).

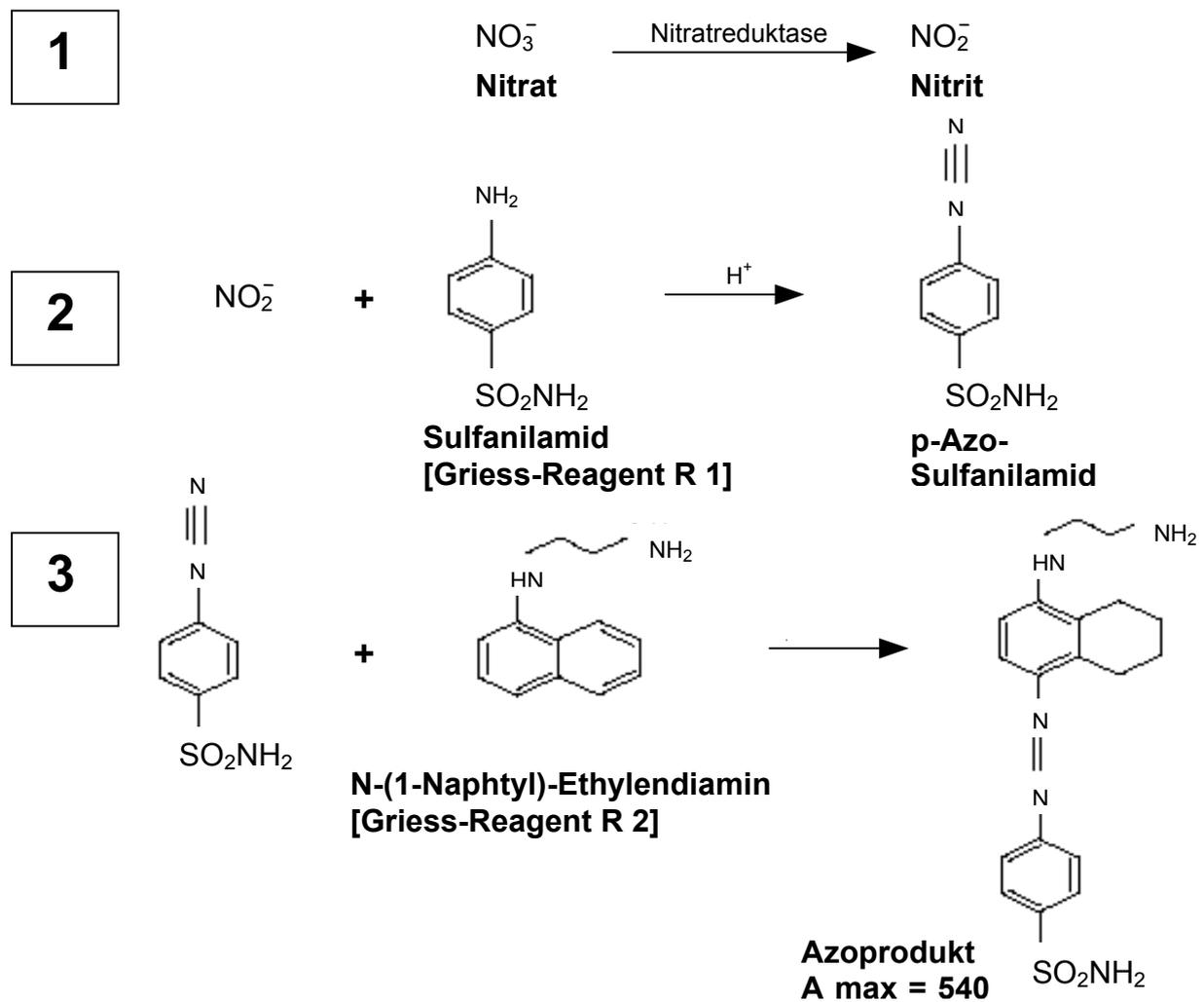


Abbildung 3-4: Reaktionsschema zum Nachweis von Gesamtnitrit durch Griess Reagenz. Im ersten Schritt wird durch die Nitratreduktase sämtliches Nitrat zu Nitrit reduziert. Dieses reagiert im säuerlichen Milieu mit Griess-Reagenz 1 zu p-Azo-Sulfanilamid (Diazotierung), das im Schritt drei mit Griess-Reagenz 2 zu einem rot-violetten Azoprodukt reagiert. Dieses Reaktionsprodukt kann bei 540 nm detektiert werden.

Für die Bestimmung des NO-Gehaltes wurden die zellulären Überstände nach einer 24 h dauernden Inkubation mit Testsubstanzen gesammelt. Je 100 µl des zellfreien Kulturüberstands wurden in eine Flachboden-Mikrotiterplatte überführt und mit 100 µl Griess-Reagenz gemischt. Nach einer 10 minütigen Inkubation im Dunkeln erfolgte die Messung der Absorption bei 540 nm im ELISA-Reader. Die NO_2^- -Konzentration errechnet sich anhand einer Standardkurve (0 µM - 50 µM NaNO_2 im Stimulationsmedium).

Zur Hemmung der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) wurden L-NMMA (0,5 und 1 mM) und L-NIL (0,5 und 1 mM) eingesetzt. Die hemmenden Effekte der NOS-Inhibitoren wurden durch Substratüberschuss von L-Arginin (2,5 - 10 mM) antagonisiert. Zum Vergleich wurde auch D-Arginin, das nicht metabolisiert wird, als zusätzliche Kontrolle getestet.

Manche Metaboliten des Mevalonat-Stoffwechsels spielen durch ihre Funktion in der Signalübertragung eine bedeutende Rolle für die Transformation und das Wachstum der Zellen (Fairbanks et al., 1984; Schafer et al., 1989; Quesney-Huneeus et al., 1979). Aus diesem Grund sollte in der vorliegenden Arbeit geprüft werden, ob die unter Cerivastatin erhöhte iNOS-Aktivität der MZ sich durch eine Koinkubation mit Mevalonat (100 μ M) beeinflussen lässt. Hierzu wurde die inaktive Laktonform der Mevalonsäure in die aktive Form des Mevalonats wie bei O'Donnel (1993a) beschrieben konvertiert.

3.6 Bestimmung von Prostaglandinen durch Radio-Immuno-Assay

Hierzu wurden stabile Degradationsprodukte der Prostaglandine E_2 , I_2 und TxA_2 in Kulturüberständen gemessen. Bestimmt wurden bicyclo-PGE₂ als stabiler Indexmetabolit für PGE₂, 6-keto-PGF_{1 α} als Degradationsprodukt von PGI₂ und TxB_2 als Degradationsprodukt von TxA_2 . Alle Metaboliten wurden mittels Radio-Immuno-Assays unter Verwendung spezifischer Antikörper gemessen (Schrör und Seidel, 1988).

3.7 RNA-Analyse

3.7.1 RNA-Isolierung

Für die Isolierung der gesamten Ribonukleinsäuren (RNA) aus den Zellkulturen wurde RNeasy Mini Kit von QIAGEN verwendet. Zu einem bestimmten Zeitpunkt wurde das Medium von den Zellen abgenommen, diese mit PBS gewaschen und mit 300 bis 600 μ l RLT-Puffer (mit β -Mercaptoethanol), welcher das denaturierend wirkende Guanidinisothiocyanat (GITC) beinhaltet, lysiert. Die Lysate wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die

Lysatproben 5 min bei 37°C inkubiert, bis alle Salze vollständig gelöst waren, und durch Abzentrifugieren auf QIAshredder-Säulen homogenisiert. Danach wurde dem Homogenisat 70% Ethanol zugegeben und die Proben wurden auf die RNeasy *mini spin* Säulen überführt, wo die gesamte RNA an *silica-gel-based* Membranen gebunden wurde. Nach den Waschschritten mit RW1 Puffer wurde die RNA mit DEPC-behandeltem H₂O eluiert.

3.7.2 RNA-Quantifizierung

Zur Feststellung der RNA-Konzentrationen in Lösungen wurde eine photometrische Bestimmung durchgeführt. Die spektralphotometrische Messung verdünnter Nukleinsäurelösungen (1:250) erfolgte in Quarzglasküvetten bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm.

Es besteht ein direkter Bezug zwischen der Extinktion und der RNA-Konzentration: Der gemessene Absorptionswert von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm einer RNA-Lösung gegen das entsprechende Lösungsmittel entspricht einer Konzentration von 40 µg/ml.

Die Konzentration der RNA wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{mg/ml RNA} = \text{OD}_{260} \times V \times F$$

V - Verdünnungsfaktor

F - Multiplikationsfaktor für RNA = 0,04

Die Reinheit der Präparation wurde anhand des Verhältnisses $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ überprüft. Bei einer Ratio für RNA von 1,8 - 2,0 geht man von einer geringen Verunreinigung aus.

3.7.3 Untersuchung der Genexpression mittels RT-PCR

3.7.3.1 cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA (Reverse Transkription)

Die mRNA wird mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben. Das resultierende Desoxyribonukleinsäure-Molekül entspricht nicht der genomischen DNA-Sequenz, sondern repräsentiert die Exon-Struktur des Gens. Um die gesamte RNA-Population zu erfassen, wurden unspezifische Hexaoligonukleotide als Random-Primer eingesetzt. Bevor die RNA in cDNA umgeschrieben wurde, wurde ein DNA-Verdau vorgenommen (Dilworth und McCarrey, 1992). Hierzu wurde 0,25 µg -1 µg RNA in einem 19 µl Reaktionsansatz mit DNase I (10 U/1µg RNA) über 30 min bei 37°C in einem Thermo Cycler inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch 5-minütige Denaturierung bei 90°C gestoppt, und die Proben wurden auf dem Eis abgekühlt. Nach der Zugabe von 1 µl Reverse Transkriptase (RT) folgte die cDNA-Synthese: 10 min bei 25°C und weitere 50 min bei 42°C. Durch einen abschließenden Schritt für 5 min bei 95°C wurde die RT inaktiviert. Die Proben mit cDNA wurden dann mit 80 µl dH₂O verdünnt und bei -20°C gelagert.

Reaktionsansatz für DNA-Verdau und Reverse Transkription:

- PCR-Puffer: 50 mM Tris-HCL pH=8,3; 75 mM KCL; 3 mM MgCL₂
- 0,5 mM dNTPs
- 12 mM DTT
- 0,105 mg/ml BSA
- 26 µM Random-Primer pd N/6 Hexamer
- 1 U/µl RNasin
- 10 U Rnase-free DNase I
- 200 U M-MLV - Zugabe nach dem DNA-Verdau und Denaturierung
- H₂O
- Gesamtvolumen: 20 µl

3.7.3.2 Polymerase-Kettenreaktion PCR

Die gewonnene cDNA (3.7.3.1) wurde in die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl.: *polymerase chain reaction*) eingesetzt.

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine *in vitro* Methode zu einer Vervielfältigung spezifischer DNA-Fragmente mit definierter Länge und Sequenz aus einer kleinen Menge eines komplexen Gemisches. Die gewünschte DNA-Sequenz wird durch Erhitzen in die Einzelstränge zerlegt und mit Hilfe von Primern, Desoxyribonukleotiden und einer DNA-Polymerase enzymatisch kopiert. Die so erhaltene DNA wird in sich wiederholenden Reaktionszyklen erneut als Matrize für DNA-Synthese eingesetzt (Saiki et al., 1985; Mullis und Faloona, 1987).

Die Reaktionsansätze hatten ein Volumen von 25 µl und enthielten cDNA (5 - 10% von RT-Produkt) als Matrize, PCR-Reaktionspuffer, dNTP-Mix, Primer, Hot Star Taq DNA-Polymerase und dH₂O.

Tabelle 3-2: Primer-Sequenzen.

Amplifiziertes Gen	Basensequenz der Primer
c-fos	Sense: 5`- GAG CTG ACA GAT ACA CTC CAA GCG - 3` Anti-sense: 5`- CAG TCT GCT GCA TAG AAG GAA CCG - 3`
Egr-1	Sense: 5`- CTT CAG TCG TAG TGA CCA CCT TAC C - 3` Anti-sense: 5`- CAT GTC TGA AAG ACC AGT TGA GGT GC - 3`
PDGF-B	Sense: 5`- GAG ATG CTG AGT GAC CAC TC - 3` Anti-sense: 5`- CGA ATG GTC ACC CGA GTT TG - 3`
GAPDH	Sense: 5`- GCT GGG GCT CAC CTG AAG GG - 3` Anti-sense: 5`- GGA TGA CCT TGC CCA CAG CC - 3`

Die Primer für die *c-fos*-PCR wurden von Kreisberg et al. (1994), für die *Egr-1*-PCR von Chen et al. (1997) und für die *PDGF-B*-PCR von Harada et al. (1998) übernommen. Die *GAPDH*-Primersequenz wurde nach El-Husseini et al. (1994) erstellt. Mit der Herstellung der Primer wurde die Interactiva beauftragt.

Die Bedingungen und Zusammensetzung der Reaktionsansätze für die semiquantitative PCR zur Quantifizierung der Expressionsstärke bestimmter Gene wurden bezüglich der Primerkonzentration, der Annealingtemperatur, Nukleotidkonzentration, der Templatmenge (cDNA) und der Zyklenzahl optimiert (Tabelle 3-3 und Tabelle 3-4). Bei der semiquantitativen PCR wird neben dem Zielgen ein Referenzgen (*GAPDH*) als interner Standard in demselben Reaktionsansatz

koamplifiziert (multiplex PCR) (Chamberlain et al, 1988). Durch die Messungen gegen ein stabil exprimiertes Standardgen konnten Expressionsunterschiede unter Stimulation mit Wachstumsfaktoren und der Behandlung mit Medikamenten bestimmt werden.

Tabelle 3-3: Reaktionsansätze für semiquantitative PCR.

Komponenten	Zielgen		
	c-fos	Egr-1	PDGF-B
10 x PCR-Puffer	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
10 mM dNTPs	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
10 µM sense Primer-Zielgen	1,25 µl	1,5 µl	0,75 µl
10 µM antisense Primer-Zielgen	1,25 µl	1,5 µl	0,75 µl
10 µM sense Primer GAPDH	0,25 µl	0,25 µl	0,125 µl
10 µM antisense Primer GAPDH	0,25 µl	0,25 µl	0,125 µl
5 x Q-Solution	-	-	5 µl
CDNA	2,5 µl	2,5 µl	5 µl
Hot StarTaq DNA-Polymerase 5 U/µl	0,25 µl	0,25 µl	0,25 µl
DH ₂ O	16,25 µl	15,75 µl	10 µl
Gesamtvolumen	25 µl	25 µl	25 µl

Die PCR wurde im Thermo-Cycler nach folgendem Standard Protokoll durchgeführt: (Tabelle 3-4).

Tabelle 3-4: PCR-Bedingungen für die Amplifikation der Zielgene.

Gen	Initiale Denaturierung	Denaturierung	Primer-Annealing	Extension	Zyklen-zahl	Finale Extension
c-fos	95°C, 15 min	94°C, 1min	58°C, 30 sec	72°C, 1,5 min	32	72°C, 8 min
Egr-1	95°C, 15 min	94°C, 1min	62°C, 1 min	72°C, 1,5 min	32	72°C, 10 min
PDGF-B	95°C, 15 min	94°C, 1min	58°C, 1 min	72°C, 1,5 min	38	72°C, 10 min

3.7.3.3 β -Actin-PCR zur Kontrolle der cDNA-Qualität

Bei der β -Actin-Kontroll-PCR lagen die Primer (β -Actin-5' und -3') in benachbarten Exons, so dass die amplifizierte Sequenz die Intronsequenz zwischen zwei Exons beinhaltet. Wäre die isolierte RNA mit DNA kontaminiert gewesen, wäre die Intronsequenz der genomischen DNA mitamplifiziert gewesen. Die PCR-Produkte der genomischen DNA wären um 206 bp größer als die cDNA-Amplifikate (652 bp gegenüber 446 bp). Aufgrund der unterschiedlichen Länge wären die Amplifikate der genomischen und der cDNA in einem Agarosegel gut aufgetrennt. Bei kontaminationsfreier RNA war nach der reversen Transkription bei der β -Actin-PCR keine Bande zu sehen, die der genomischen Sequenz entsprach.

Die Primersequenzen waren folgend:

Sense: 5' - AGA GAT GGC CAC GGC TGC TT - 3'
 Anti-sense: 5' - ATT TGC GGT GGA CGA TGG AG - 3'

Tabelle 3-5: Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen für β -Actin-Kontroll-PCR.

PCR-Ansatz (25 μ l)	PCR-Bedingungen
2,5 μ l PCR-Puffer 10 x	Initiale Denaturierung 95°C 15 min
0,5 μ l 10 mM dNTPs	Denaturierung 94°C 1 min
2 μ l Primer 5'	Primer - Annealing 62°C 1 min
2 μ l Primer 3'	Extension 72°C 1 min
0,25 μ l Hot Star Taq Polymerase	Zyklenzahl 32
2,5 μ l cDNA	Finale Extension 72°C 8 min
H ₂ O	

3.7.3.4 Elektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten

Die Auftrennung von PCR-Produkten erfolgte in 1,8%-igen (w/v in TBE-Puffer) Agarosegelen. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese 5:1 mit Probenpuffer versetzt. Die Fragmentgrößenbestimmung wurde im Vergleich mit einer 100 bp DNA-Leiter durchgeführt. Die Gelelektrophorese fand in einer horizontalen Elektrophoresekammer (15 cm x 20 cm) bei 120-140 V für 2-3 h statt. Zur Detektion der Fragmente wurde das Gel nach dem Lauf in einer Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml) für 30 min gefärbt. Die DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht (254 nm) durch die Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids sichtbar gemacht und mit einer PC-gestützten Videodokumentationsanlage (Gel DocTM 1000 UV *fluorescent gel documentation system*) fotografiert.

TBE-Puffer:

89 mM Tris-HCL pH 7,6
89 mM Borsäure
2 mM EDTA

6x DNA-Probenpuffer:

40% Glycerin
50 mM EDTA, pH 8,0
10 mM TRIS, pH 8,0
0,1% Bromphenolblau

Die densitometrische Auswertung der RT-PCR-Produkte wurde mit Hilfe des Komplettsystems der Firma Raytest (Straubenhardt; Software: Tina 2.09) durchgeführt. Die gemessene OD galt hierbei als Maß der Expressionsstärke. Die Expression des Zielgens wurde als % OD berechnet:

$$\% \text{ OD} = \frac{\text{OD Zielgen}}{\text{OD Referenzgen}} \times 100\%$$

3.7.3.5 Sequenzierung von PCR-Produkten

Die Sequenzierung von PCR-Produkten fand als Auftragssequenzierung statt. Diese wurde an der Heinrich-Heine Universität im Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) mittels "ABI Prism"-Sequenzierautomat durchgeführt. Die Sequenzierungen wurden mit spezifischen oder Standard-Oligonukleotiden unter den vom Hersteller des Gerätes angegebenen Bedingungen durchgeführt.

Die Analyse der eingebrachten nach PCR Amplifikation erhaltenen Fragmente durch DNA-Sequenzierung ergab, dass die analysierten Amplifikate das erwartete Fragment-Muster aufweisen (Tab. 3-6). Sie stimmen mit den Sequenzen überein, die mit Hilfe des Programms "Blast Sequences" in einer zentralen Gen-Sequenz-Bank zu finden sind: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>

Tabelle 3-6: Sequenzen-Kontrolle

MRNA	Locus, Version	Autor	Medline
Ratte c-fos	RNCFOSR X06769.1 GI: 55933	Curran, T., Gordon, M.B. Rubino, K.L. Sambucetti, L.C.	88143713
Ratte Egr-1	RATNGFIA J04154.1 GI: 340542	Changelian, P.S. Feng, P., King, T.C. Milbrandt, J.	89098920
Maus PDGF-B	XM_122916 GI: 20902844	NCBI Annotation Project	
Ratte GAPDH	NM_017008 GI: 8393417	Tso, J.Y., Sun, X.H. Kao, T.H., Reece, K.S. Wu, R.	85215629

3.7.4 mRNA-Analyse im Northern-Blot

Im Gegensatz zur DNA muss RNA in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt werden, um die Bildung der sekundären Strukturen zu vermeiden. Zur Denaturierung werden Formamid und Formaldehyd verwendet. Nach der Gelelektrophorese wird die elektrophoretisch aufgetrennte RNA vom Gel auf eine nukleinsäurebindende

Nitrocellulose- oder Nylonmembran übertragen, wo sie fixiert werden kann. Dabei bindet die denaturierte RNA als Einzelstrang, so dass einzelsträngige Sequenzen entstehen, an die eine Nukleinsäuresonde hybridisieren kann (Martin, 1996).

3.7.4.1 Denaturierende Gelelektrophorese einzelsträngiger mRNA

Vor dem Gellauf musste die RNA konzentriert werden. Dazu wurde die benötigte RNA-Menge 20 µg je Probe mit DEPC-H₂O auf 100 µl aufgefüllt und durch Zugabe von 10 µl 3 M Natriumacetat (CH₃COONa), pH 5,2 und 2,5 Volumen Ethanol (96%) über Nacht bei - 80°C ausgefällt. Nach Zentrifugation für 30 min bei 13000 rpm, bei 4°C wurde RNA-Pellet in 100 µl 70% (v/v) Ethanol gewaschen, erneut abzentrifugiert und das RNA-Pellet bei 37°C im Thermoblock getrocknet. Danach wurden die RNA-Proben in 10 µl DEPC-H₂O resuspendiert, mit 10 µl Denaturierungspuffer versetzt, 15 min bei 65°C denaturiert und schnell auf dem Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Proben mit 4 µl 6x RNA-Ladepuffer gemischt und auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen. Als Laufpuffer wurde 1 x MOPS-Puffer verwendet. Die Laufzeit betrug 3 h bei 90 V angelegter konstanter Spannung.

Denaturierungspuffer

633 µl Formamid
 133 µl 10 x MOPS
 234 µl 37% Formaldehyd
 1000 µl 1 Woche haltbar bei - 20°C

6 x Ladepuffer

40% (v/v) Glycerol
 50 mM EDTA, pH 8,0
 10 mM Tris, pH 8,0
 0,1% Bromphenolblau

10 x MOPS pH 5,5 - 7,5

200 mM MOPS
 50 mM Natriumacetat
 10 mM EDTA

1% Agarose-Denaturierungsgel

4 g Agarose in 340 ml H₂O
 zum Lösen aufkochen,
 abkühlen auf 60°C
 40 ml 10 x MOPS
 20 ml 37% Formaldehyd

3.7.4.2 Northern-Blot

Hierzu musste das Gel vom Formaldehyd befreit werden, indem das Gel 2 x 30 min im 2 x SSC-Puffer schwenkend inkubiert wurde. Eine Plastikschaale wurde mit 20 x SSC-Puffer gefüllt und eine Glasplatte als Brücke über die Schale gelegt. Danach wurde ein mit 2 x SSC angefeuchtes Streifen Whatmann 3 MM Papier auf die Glasbrücke so gelegt, dass die Enden des Papiers in die Pufferlösung tauchten. Anschließend wurde das RNA-Gel mit der Frontseite nach unten auf das Whatmann-Papier platziert und mit einer auf die Gelgröße zurechtgeschnittene Nylonmembran, die zuvor im 2 x SSC-Puffer getränkt wurde, bedeckt. Darauf wurden noch zwei feuchte gleichgroße Lagen Whatmann-Papier gelegt. Um die Kapillarwirkung zu optimieren, kam auf die Whatmann-Papierschicht ein ca. 10 cm hoher Stapel trockene Papiertücher, der mit einer Glasplatte und einem Gewicht von 1 kg beschwert wurde.

Das Blotting fand über Nacht statt. Anschließend wurde der Blot abgebaut, die RNA im UV-Strahlengerät durch die UV-Bestrahlung an der Nylonmembran fixiert. Die einzelsträngigen Moleküle werden bei der UV-Fixierung mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrat an die Membran geheftet, so dass die Basen frei bleiben und sich bei der nachfolgenden Hybridisierungsreaktion mit komplementären Nukleinsäuremolekülen einer spezifischen Sonde paaren können.

20 x SSC

- 3,0 M NaCl
- 0,3 M Na-Citrat
- pH 7,0

3.7.4.3 Hybridisierung mit mRNA-spezifischen Gensonde

Die Membran wurde 2 h in einer verschließbaren Glasflasche im Hybridisierungssofen bei 42°C mit Prähybridisierungspuffer unter ständiger Rotation gespült. Danach folgte die Inkubation für 12 - 24 h mit der radioaktiven Sonde unter gleichen Bedingungen wie bei der Prähybridisierung. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von iNOS untersucht. Als Sonde wurde (Maus) iNOS cDNA clone EcoRI/PstI Insert von

Plasmid B2 verwendet. Der 611 bp DNA-Fragment wurde mit 32 -P-dNTPs durch Random Priming radioaktiv markiert. Die unspezifischen Hybridisierungen wurden durch Waschen 2 x 15 min mit einer Waschlösung 1 (2 x SSC, 0,1% SDS) und anschließendes Waschen 30 min mit Waschlösung 2 (0,2 x SSC, 0,1% SDS) bei 42°C entfernt. Für die Detektion der Hybridisierungsbanden wurde der gewaschene Blot in Klarsichtfolie eingeschlagen und für 15 h auf einer Detektorfolie bei RT exponiert. Anschließend konnte die Intensität der Banden mit Hilfe des automatischen Detektorsystems BAS 1500 von Fuji Film (Raytest, Straubenhardt, Germany) quantifiziert werden. Zur Standardisierung der aufgetragenen RNA-Mengen diente Rehybridisierung mit der Sonde für ein "housekeeping gene", hier GAPDH.

Prähybridisierungspuffer

- 5 x Denhardt's Lösung
- 5 x SSC
- 50 mM Na₃PO₄
- 0,1% (w/v) SDS
- 1 mg/ml Heringsperma DNA
- 50% Formamid

3.8 Untersuchungen von Proteinen

3.8.1 Proteinisolierung

Nach einer bestimmten Stimulationsphase und der Behandlung mit Medikamenten wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 0,5 - 0,6 ml eiskaltem Lysispuffer solubilisiert und für 15 min auf dem Eis stengelassen. Danach wurden die Zellysate mit Hilfe einer Tuberkulinspritze mit einer feinen Nadel geschert und nachfolgend 4 min bei 4°C bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Überstände, die Proteine enthielten, wurden anschließend gesammelt und bis zur weiteren Verwendung bei - 20°C aufbewahrt.

Lysispuffer (Endkonzentrationen):

- 20 mM Tris-CL Puffer, pH 7,5
- 1 mM EDTA
- 1 mM EGTA
- 1% Triton X-100
- 25 µg/ml Leupeptin
- 1 mM PMSF
- 2 mM DTT

3.8.2 Bradford-Test

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Zellysate erfolgte photometrisch mit der Hilfe eines auf der Methode von Bradford (1976) beruhenden Bio-Rad-Proteinassays (Bio-Rad, München). Bei der Bindung von „Coomassie brilliant blue G-250“ an Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum der Farbe (von 465 nm ohne Protein auf 595 nm mit Protein). Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung.

Für die Messung wurden 5 -10 µl Probe mit H₂O_{dest.} auf 400 µl verdünnt und mit 100 µl Bio-Rad-Reagenz versetzt. Nach einer 10 minütigen Inkubation im Dunkeln bei RT wurde die Extinktion bei 595 nm bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde nach einer mit BSA (Rinderserumalbumin) erstellten Eichgerade ermittelt.

3.8.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Prinzip dieses elektrophoretischen Verfahrens ist es, die Proteine durch Zugabe des sich an sie anlagernden Detergens SDS mit einer einheitlich negativen Ladung zu versehen. Durch vorhergehendes Denaturieren mit z. B. DTT oder β-Mercapto-Ethanol werden Sekundärstrukturen weitgehend aufgebrochen, so dass die Proteine letztlich im elektrischen Feld streng ihrer Größe nach aufgetrennt werden können.

Die Auftrennung von Proteinen wurde in einem diskontinuierlichen Gelsystem (Mini-PROTEAN II) nach LAEMMLI (1970) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Auftrennung der Proteine wurden 4%-ige Acrylamid-Sammelgele und 6 - 15% -ige Acrylamid-Trenngele, je nach Molekulargewicht des Zielproteins, verwendet.

Die Proben wurden auf eine einheitliche Proteinkonzentration (10 - 20 µg Protein) eingestellt, mit 6 x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Parallel zu den Proteinproben wurde ein Molekulargewichtsstandard, der sogenannte „Rainbowmarker“ auf das Gel aufgetragen. Dieser Marker enthält in verschiedenen Farben vorgefärbte Proteine, die während der Elektrophorese im Gel zu sehen sind. Die Elektrophorese erfolgte im Tris-Glycin Laufpuffer für 60 - 75 min bei 200 V. Anschließend wurden die Gele mit Coomassie Brillantblau gefärbt.

Tabelle 3-7: Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE von Proteinen

Gelkomponenten	Sammelgel 4%	Trenngel 6%	Trenngel 8%	Trenngel 12%	Trenngel 15%
0,5 M Tris-HCL pH 6,8	2,5 ml				
1,5 M Tris-HCL pH 8,8		2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid	1,33 ml	2 ml	2,7 ml	4 ml	5 ml
H ₂ O _{dest.}	6,1 ml	5,3 ml	4,6 ml	3,3 ml	2,3 ml
10% (w/v) SDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
10% (w/v) APS	60 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10-20 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl

Tris-Glycin Laufpuffer

25 mM Tris
192 mM Glycin
0,1% (w/v) SDS

6 x SDS-Probenpuffer

150 mM Tris-HCL pH 6,8
40% (v/v) Glycerin
12% (w/v) SDS
0,12 % (w/v) Bromphenolblau
15% (v/v) β-Mercaptoethanol
0,004% (w/v) Pyrolinlösung

Coomassie Brillantblau Färbung

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden die Gele für 5 - 15 min in der Coomassie-Brillantblau-Lösung gefärbt und anschließend wurde der Gelhintergrund mit der Entfärbelösung bis zum gewünschten Grad entfärbt.

Coomassie-Färbelösung

45% (v/v) Methanol
9% (v/v) Eisessig
0,25% (v/v) Coomassie Brillantblau

Entfärbelösung

30% (v/v) Methanol
7,5% (v/v) Eisessig

3.8.4 Western-Blot

Die in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden in einer Semi-Dry Blotkammer auf eine PVDF-Membran übertragen. Die dafür benötigten Filterpapiere wurden zuvor in Towbin-Puffer getränkt und auf der Anodeplatte platziert. Die PVDF-Membran wurde zuerst 1 min in Methanol getaucht, kurz mit H₂O abgespült, 2 - 3 min im Towbin-Puffer äquilibriert und auf das Filterpapier gelegt. Auf diesen Papier-Membran-Stapel wurde das Gel, das vorher ca. 10 min in Towbin-Puffer äquilibriert wurde, platziert und von der letzten Papierschicht bedeckt. Anschließend wurde das System mit der Kathodenplatte abgeschlossen.

Der Proteintransfer erfolgte bei Raumtemperatur über 1 h bei konstanter Spannung von 15 - 20 V.

Towbin-Puffer (Towbin *et al.*, 1979)

- 25 mM Tris
- 192 mM Glycin
- 20% (v/v) Methanol

Der Erfolg des Transfers konnte an dem verwendeten Marker überprüft werden.

3.8.5 Nachweis von Proteinen – Immunfärbung

Nach erfolgtem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran (3.8.4) wurde diese zuerst 10 min in TBS-Puffer und dann 1 h in Blockierungslösung inkubiert, um die unspezifische Bindung von Proteinen zu blockieren und dadurch Hintergrundfärbungen zu reduzieren. Danach folgte eine Inkubation über 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit dem ersten Antikörper in TBS-Tween-Puffer oder Blockierungslösung (Tab 3.8). Der Primärantikörper reagiert spezifisch mit dem Zielprotein (Anti-Antigen-Antikörper). Danach wurde der Blot 3 mal 10 min mit TBS-Tween-Puffer gewaschen und mit dem mit HRP- konjugierten zweiten Antikörper 45 - 60 min inkubiert (Tab 3.8). Nach weiteren Waschschritten: 2 mal 10 min mit TBS-Tween-Puffer und 1 mal 10 min mit TBS-Puffer wurde der Blot mit 1 ml ECL-Reagenz überschichtet und in eine durchsichtige Folie eingeschlagen. Die sofortige Oxidation des Luminols durch die an Antikörper gekoppelte Peroxidase bewirkt eine Chemilumineszenz, die durch Exponieren mit einem Film gemessen werden kann. Die Detektion der bestimmten Proteine in dieser Arbeit erfolgte mit einem Röntgenfilm, der je nach Antikörper für eine bestimmte Zeit auf der Folie exponiert wurde (Tab 3.8).

Tabelle 3-8: Immundetektion

Protein	Blockierungslösung	1 Antikörper	2 Antikörper	Exposition
INOS MW 140 kD	2 - 4% BSA in TBS -T	Anti-iNOS polyclonal Kaninchen IgG 1 : 2500	Esel anti- Kaninchen IgG -HRP 1 : 7500	5 - 10 sec
COX-2 MW 75 kD	2 - 4% BSA in TBS -T	Anti-COX2 monoclonal Mouse IgG1 1 : 500	Schaf anti- Mouse IgG -HRP 1 : 5000	5 - 10 min
PDGF-B MW 26 kD	3% BSA + 3% Magermilchpulver in TBS -T	Anti-PDGF-B polyclonal Kaninchen IgG 1 : 250	Ziege anti-Kaninchen IgG-HRP 1 : 2000	30 min
PDGFR β MW 180 kD	3% BSA + 3% Magermilchpulver in TBS -T	Anti PDGFR β monoclonal Mouse IgG2b 1 : 50	Schaf anti-Mouse IG-HRP 1 : 5000	1 min
PKB α /Akt MW 60 kD	2 - 4% BSA in TBS -T	Anti- PKB α /Akt polyclonal Maus IgG 1 : 6000	Schaf anti-Mouse IG-HRP 1 : 5000	5 - 10 min
Phospho- PKB/Akt MW 60 kD	2 - 4% BSA in TBS -T	Anti- Phospho- Ser ⁴⁷³ -PKB/Akt polyclonal Kaninchen IgG 1 : 1000	Esel anti- Kaninchen IgG -HRP 1 : 7500	30 min
Actin MW 43 kD	3% BSA + 3% Magermilchpulver in TBS -T	Anti-Actin monoclonal Maus IgG 1: 1000	Schaf anti-Mouse IgG-HRP 1 : 10000	5 - 20 sec
β -Tubulin MW 51-54 kD	3% BSA + 3% Magermilchpulver in TBS -T	Anti-Tubulin polyclonal Kaninchen IgG 1: 1000	Ziege anti- Kaninchen IgG-HRP 1 : 10000	5 - 20 sec

TBS-Puffer

20 mM Tris-HCL pH 7,6
137 mM NaCl

TBS-Tween-Puffer

20 mM Tris-HCL pH 7,6
137 mM NaCl
0,2% (v/v) Tween 20

Prüfung der gleichmäßigen Proteinbeladung

Nach der Detektion wurde die PVDF-Membran in einer Amidoschwarz-Lösung 10 min lang gefärbt. Nach der Entfernung der überschüssigen, nicht Protein-gebundenen Farbstoffmenge mit einer Entfärbelösung wurden die Proteinbanden sichtbar und die Gleichmäßigkeit der Proteinbeladung auf der Membran wurde kontrolliert.

Amidoschwarz-Lösung

25% Isopropanol
10% Essigsäure
0,1% Amidoschwarz

Entfärbelösung

25% Isopropanol
10% Essigsäure

3.9 Isolierung von Kernproteinen

Für die Kernprotein-Präparation wurden alle Arbeiten auf Eis oder bei 4°C durchgeführt. Nachdem das Medium abgenommen wurde, wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 - 2 ml PBS mit 0,1 mM EDTA 5 min lang bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Platten sofort aufs Eis gelegt, die Zellen wurden vom Boden abgeschabt, in die Eppendorf-Cup überführt und anschließend für 1 min bei 5000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 300 µl Puffer A resuspendiert und 15 min auf dem Eis stehen gelassen. Danach folgte Zugabe von 20 µl 10% IGEPAL-CA 630, die Proben wurden gevortext, und die so erhaltenen Kerne wurden 1 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Zur Gewinnung der Kernprotein-Extrakte wurden die Pellets in 70 µl Puffer C vorsichtig aufgenommen und weiter für 20 min geschüttelt. Anschließend wurden die lysierten Kerne 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand, der die Kernproteine enthielt, wurde portioniert und im flüssigen Stickstoff eingefroren. Die portionierten Kernproteine wurden bis zu weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford, wie im 3.8.1.

<u>Puffer A</u>	<u>Puffer C</u>
10 mM Hepes pH 7,9	20 mM Hepes pH 7,9
10 mM KCL	25% (v/v) Glycerol
0,1 mM EDTA	0,4 M NaCl
0,1 mM EGTA	1 mM EDTA
10 µg/ ml Aprotinin	1 mM EGTA
1 µg/ml Pepstatin	10 µg/ ml Aprotinin
0,5 µg/ml Leupeptin	1 µg/ml Pepstatin
0,5 mM DTT	0,5 µg/ml Leupeptin
0,5 mM PMSF	0,5 mM DTT
	0,5 mM PMSF

Die Proteasehemmer wurden immer kurz vor der Kernproteinextraktion zu den Puffern zugegeben.

3.9.1 EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*)

Die Bezeichnung EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) oder Bandshiftanalyse bezieht sich auf Untersuchungen von Nukleinsäure-Protein-Wechselwirkungen, die man aufgrund der veränderten Mobilität im Gel erkennen kann. DNA-Sequenzen, die in vitro von Proteinen aus Zellkern-Extrakten gebunden werden, wandern im Gel langsamer. Die Bande, die sich mit Protein im Gel abzeichnet, ist gegenüber der Bande ohne Protein nach oben verschoben (daher: bandshift).

In der EMSA-Methode werden Oligonukleotide eingesetzt, die Sequenzen bestimmter Promotorregionen haben, die für die zu untersuchenden Transkriptionsfaktoren spezifisch sind. Diese Oligonukleotide werden radioaktiv markiert und zusammen mit Kernproteinen von stimulierten Zellen in einer Hybridisierungsreaktion als Sonde eingesetzt. Wurde der gesuchte Transkriptionsfaktor in den Zellen aktiviert, bindet er das markierte Oligonukleotid.

Nach einer elektrophoretischen Auftrennung des Kernprotein-DNA-Komplexes kann dieser durch Autoradiographie detektiert werden.

In dieser Arbeit wurde die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 an mit PDGF-BB stimulierten und mit MPA behandelten Zellen untersucht. Zunächst wurde

eine radioaktiv markierte Oligonukleotid - Sonde (mit der Consensussequenz für c-Jun/ AP-1: 5'- CGC TTG ATG ACT CAG CCG GAA - 3') hergestellt. Ein Reaktionsansatz bestand aus folgenden Komponenten:

- 4 ng Oligonukleotide
- 2 µl 10x T4-Kinase Puffer
- 1 µl γ ³²P-ATP (10mCi/ml)
- 2 µl T4-Polynukleotid Kinase (10 U)
- x µl H₂O bis auf 20 µl Gesamtvolumen

Anschließend wurde dieser Reaktionsansatz für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach musste das markierte Oligonukleotid von unmarkierten sowie von nicht-eingebundener Radioaktivität abgetrennt werden. Dies geschah mittels MicroSpin™ G-25 Säulen der Firma Pharmacia gemäß Vorschrift des Herstellers.

Für eine effiziente Hybridisierungsreaktion wurde eine Sonde mit 50000 cpm Radioaktivität benötigt. Für jede Proteinprobe wurde folgender Ansatz erstellt:

- 17 µl Inkubationspuffer
- 1 µl radioaktiv markiertes Oligonukleotid (50000 cpm)
- 5 µg Kernprotein
- 2 µl H₂O_{dest.}

<u>Inkubationspuffer</u>	<u>Bindepuffer</u>	<u>TETG 1N</u>
160 µl bindender Puffer	120 mM HEPES pH 7,9	50 mM Tris pH 7,5
640 µl TETG 1N	60 mM KCL	10 mM EDTA pH 7,5
80 µl Poly d(I-C)	30 mM MgCL ₂	100 mM NaCL
80 µl β-Mercaptoethanol	40 mM Tris pH 8,0	0,1% Tween
400 µl H ₂ O _{dest.}	6 mM EDTA pH 8,0	15% Glycerol

Die Ansätze wurden 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde jede Protein-DNA-Mix mit 1 µl 0,1% Bromphenolblau versetzt und auf das 6%-iges Polyacryla-

mid-Gel aufgetragen. Als Laufpuffer wurde 0,5 x TBE verwendet. Anfangs wurde die Elektrophorese für 30 min bei 22 mA, dann 2 - 3 h bei 25 mA durchgeführt.

Nach der erfolgten Elektrophorese wurde das Gel auf einem zurechtgeschnittenen Blatt Whatmann-Papier platziert, mit einer Saran-Folie bedeckt und in einem Vakuumtrockner 1,5 - 2 h getrocknet. Durch das Auflegen eines Autoradiographiefilmes über Nacht bei RT wurden die Gel-Shift-Banden detektiert. Die Intensität der Banden konnte mit Hilfe eines Phosphorimagers (Fuji 1000) quantifiziert werden.

3.10 Auswertung der Daten und Statistik

Alle Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden als arithmetische Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt (die Anzahl der Versuchsansätze ist in den Abbildungslegenden im Ergebnisteil aufgeführt).

Der Nachweis von signifikanten Unterschieden zwischen den Gruppen (Messdaten von Versuchsansätzen einer Probe) wurde mit Hilfe der Varianzanalyse (ANOVA) ausgewertet. Hierzu wurde das Programm SPSS 11.0. verwendet.

Im ersten Schritt wurden die Gruppen auf Varianzhomogenität (Streuung) mittels Levene-Test getestet. Bei einer Signifikanz $_{\text{Levene Test}} \geq 0,05$ wurden die Varianzen als homogen und bei einer Signifikanz $_{\text{Levene Test}} < 0,05$ als inhomogen angenommen.

Im nächsten Schritt wurde mittels F-Test überprüft, ob sich die einzelnen Gruppen signifikant unterscheiden. Bei einem signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) wurde im nachfolgenden post hoc Test (Mehrfachvergleiche) überprüft, welche Gruppen sich voneinander unterscheiden. Dabei wurden die Gruppen mit homogenen Varianzen mittels Dunnett-T (2-seitig) Test und mit Tukey-HSD (*honestly significant difference*) Test analysiert. Dunnett-T Test behandelt eine Gruppe als Kontrollgruppe und vergleicht alle Gruppen mit dieser Gruppe. Beim Tukey -HSD Test werden alle Gruppen miteinander verglichen. Für alle Vergleiche der Gruppen mit inhomogenen Varianzen wurde der Dunnett-T3 Test angewendet.

Nach einem einheitlichen Sprachgebrauch werden Aussagen, die mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ behaftet sind, als signifikant (*) bezeichnet. Solche mit Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,01$ heißen sehr signifikant (**) und solche mit $p \leq 0,001$ höchst signifikant (***).

4. Ergebnisse

4.1 Proliferation von Mesangiumzellen nach Stimulation mit FCS, PDGF-BB und IL-1 β

In allen drei Versuchen zur Proliferation BrdU-Assay, MTT-Test und Zellzahlbestimmung (nicht alle Ergebnisse werden aufgezeigt) konnte gezeigt werden, dass sowohl PDGF-BB als auch IL-1 β im Vergleich zu FCS als Positivkontrolle Mesangiumzellen zur Proliferation anregen. In Abb. 4-1 ist ein repräsentatives Versuchsergebnis eines BrdU-Assays wiedergegeben.

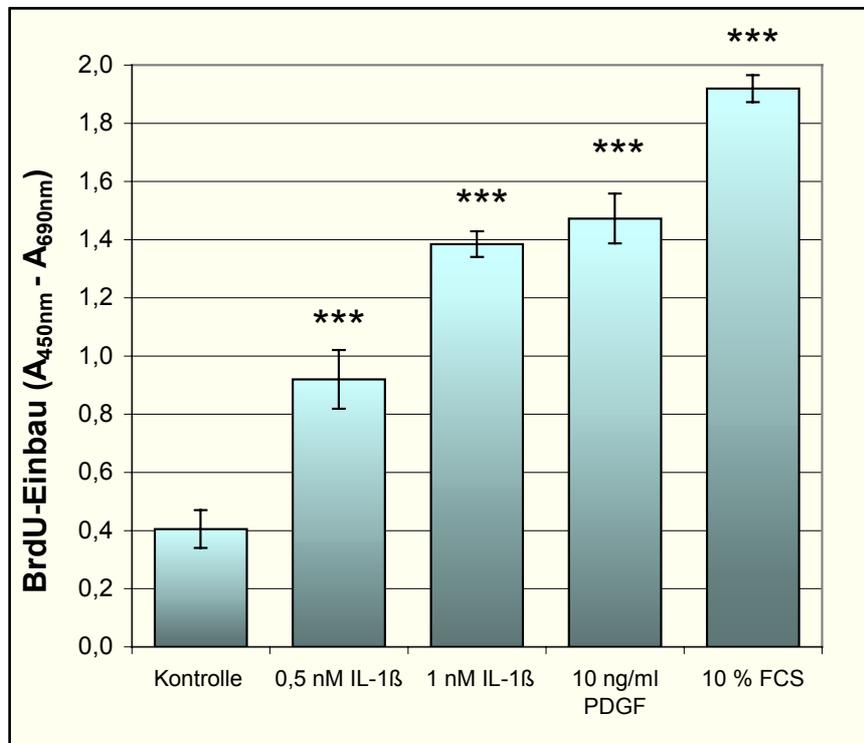


Abbildung 4-1: Proliferation von Mesangiumzellen nach Stimulation mit IL-1 β , PDGF-BB oder FCS. Subkonfluente, wachstumsarretierte Zellen wurden zum Zeitpunkt 0 mit 10 ng/ml PDGF-BB, 0,5 nM und 1 nM IL-1 β in serumreduziertem Medium (0,5% FCS) oder 10% FCS stimuliert. Nach 48 h Inkubation wurde über 18 h der BrdU-Einbau in die DNA der Zellen gemessen. (n=6, \pm SD), *** $P \leq 0,001$ vs. Kontrolle mit 0,5% FCS.

Die DNA-Synthese der Mesangiumzellen wurde unter dem Einfluss von PDGF-BB, IL-1 β und FCS im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle deutlich erhöht, was auf eine proliferationsfördernde Wirkung dieser Stimulantien hinweist. Es ist deutlich zu erkennen, dass FCS die stärkste BrdU-Einbaurrate induziert, aber auch die DNA-Synthese nach der Stimulation mit PDGF-BB oder IL-1 β signifikant ($p \leq 0,001$) war.

4.2 Untersuchung der Proliferation von Mesangiumzellen unter dem Einfluss von IS

Bei allen Proliferationsversuchen wurden die Zellen zunächst mit 10% FCS stimuliert. Dies sollte den Zustand *in vivo* nachbilden, wo die Zellen der Wirkung von verschiedenen Agonisten ausgesetzt sind.

4.2.1 Einfluss von CyA, FK-506 oder MPA auf das Wachstum von Mesangiumzellen gemessen im Trypanblau-Test

Wachstumsarretierte, subkonfluente Mesangiumzellen waren ca. 1 h mit CyA, FK-506 oder MPA (0 - 10 μ M) vorinkubiert worden, bevor die Stimulation mit 10% FCS stattfand. Zum Zeitpunkt 0 (nach Zellsynchronisierung) und nach 48 h Inkubation wurde die Zellzahl mittels Hämocytometer im Trypanblau-Test bestimmt und, wie unter 3.3.1 beschrieben, als % Wachstum der Positivkontrolle ermittelt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 4-2 dargestellt.

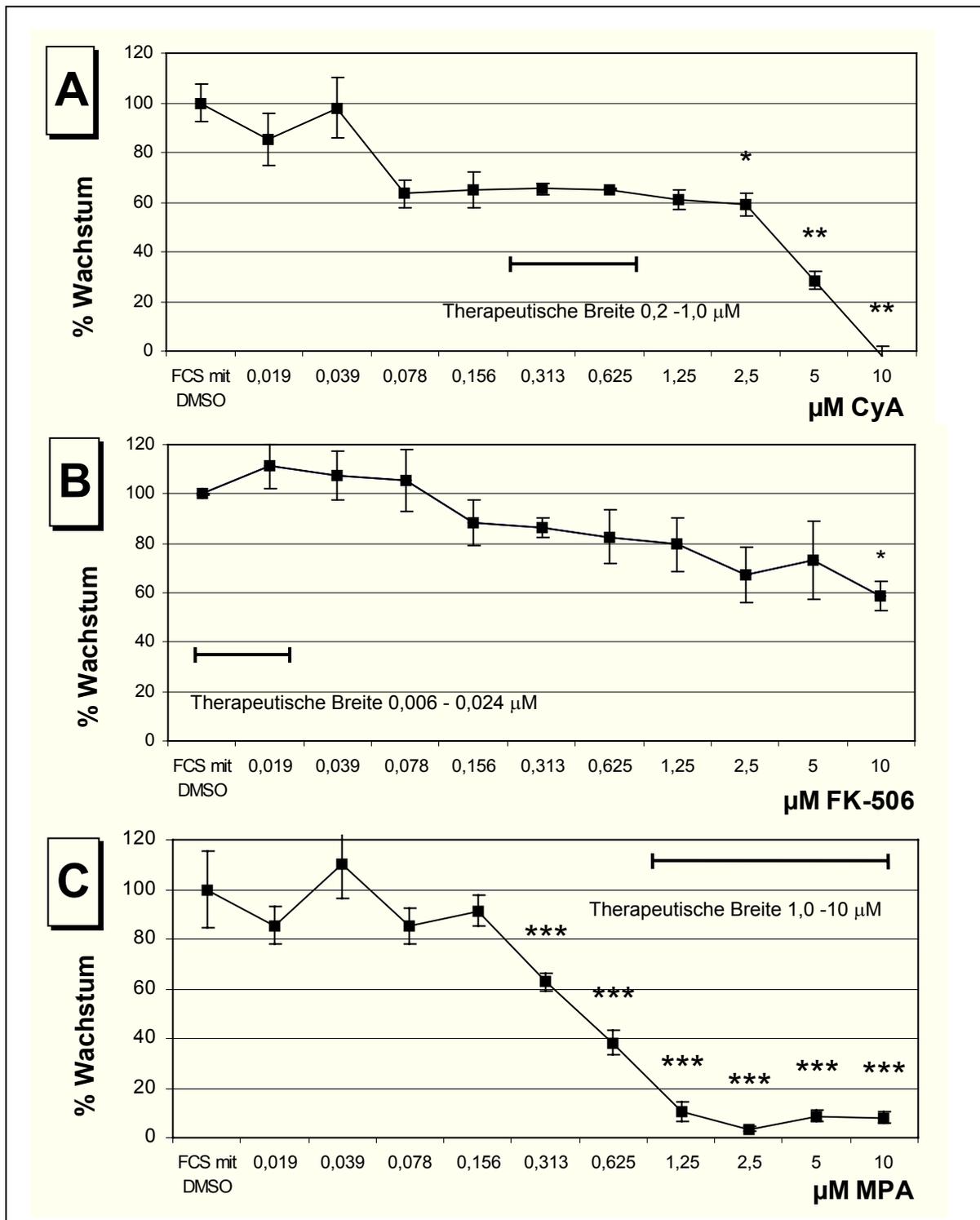


Abbildung 4-2: Einfluss der IS auf das Wachstum der Mesangiumzellen: CyA (A), FK-506 (B), MPA (C). Subkonfluente wachstumsarretierte Zellen wurden mit 10% FCS stimuliert und mit verschiedenen Konzentrationen von IS behandelt. Zum Zeitpunkt 0 (Kontrolle 0) und nach 48 h Inkubation wurde die Zellzahl im Trypanblau-Test bestimmt, und % Wachstum im Vergleich zu Kontrolle 100% (mit FCS stimulierte Zellen ohne Medikament mit Lösungsmittel) und Kontrolle 0 (Zellzahl zum Zeitpunkt 0) berechnet. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert aus drei Versuchsansätzen dar (n=3, ± SD). * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,01; *** P ≤ 0,001 vs. Kontrolle mit FCS und DMSO.

Insgesamt zeigte sich ein dosisabhängiger supprimierender Effekt von allen drei IS auf das Wachstum der Mesangiumzellen. Am effektivsten wirkte MPA, schon die Konzentration von 0,313 μM verursachte 37% Wachstumshemmung ($p \leq 0,001$). Eine IC50 erreichte MPA bei $0,44 \pm 0,03 \mu\text{M}$ und ab 1,25 μM betrug das Wachstum nur 10%.

CyA hingegen erreichte 58% Wachstum bei der Konzentration von 2,5 μM ($p \leq 0,05$), IC50 bei $3,2 \pm 0,18 \mu\text{M}$ und bei einer Konzentration von 10 μM fand keine Zellzahlzunahme statt ($p \leq 0,01$). Diese CyA-Konzentrationen liegen nicht mehr im therapeutischen Bereich für Patienten. Laut klinischer Studien (Kahan, 1982; Savoldi & Kahan, 1986; Griffith et al., 1984) betragen optimale CyA-Plasmakonzentrationen von 0,2 bis maximal 1 μM , um immunsuppressive Effekte zu erreichen.

Die Wirkung von FK-506 auf die Mesangiumzellen erwies sich als weniger effektiv, erst bei einer Konzentration von 10 μM betrug das Zellwachstum 58% ($p \leq 0,05$). Die signifikante Hemmung von FK-506 lag ebenso nicht im therapeutischen Bereich. Pharmakokinetische Studien (Regazi et al., 1999; Bekersky et al., 1999) berichten, dass an Patienten gemessenen FK-506-Konzentrationen im Plasma im Bereich 6 - 24 nM lagen.

4.2.2 DNA-Synthese von Mesangiumzellen nach der Behandlung mit CyA, FK-506 oder MPA

Zur Untersuchung, wie IS auf die DNA-Synthese wirken, wurden die Zellen nach 48 h dauernder Stimulation und medikamentöser Behandlung mit BrdU über 2 h inkubiert und OD des Reaktionsprodukts gemäß Vorschrift in Abschnitt 3.3.2 in einem Sandwich - ELISA gemessen. Die Ergebnisse des BrdU-Einbaus stellt die Abbildung 4.3 dar.

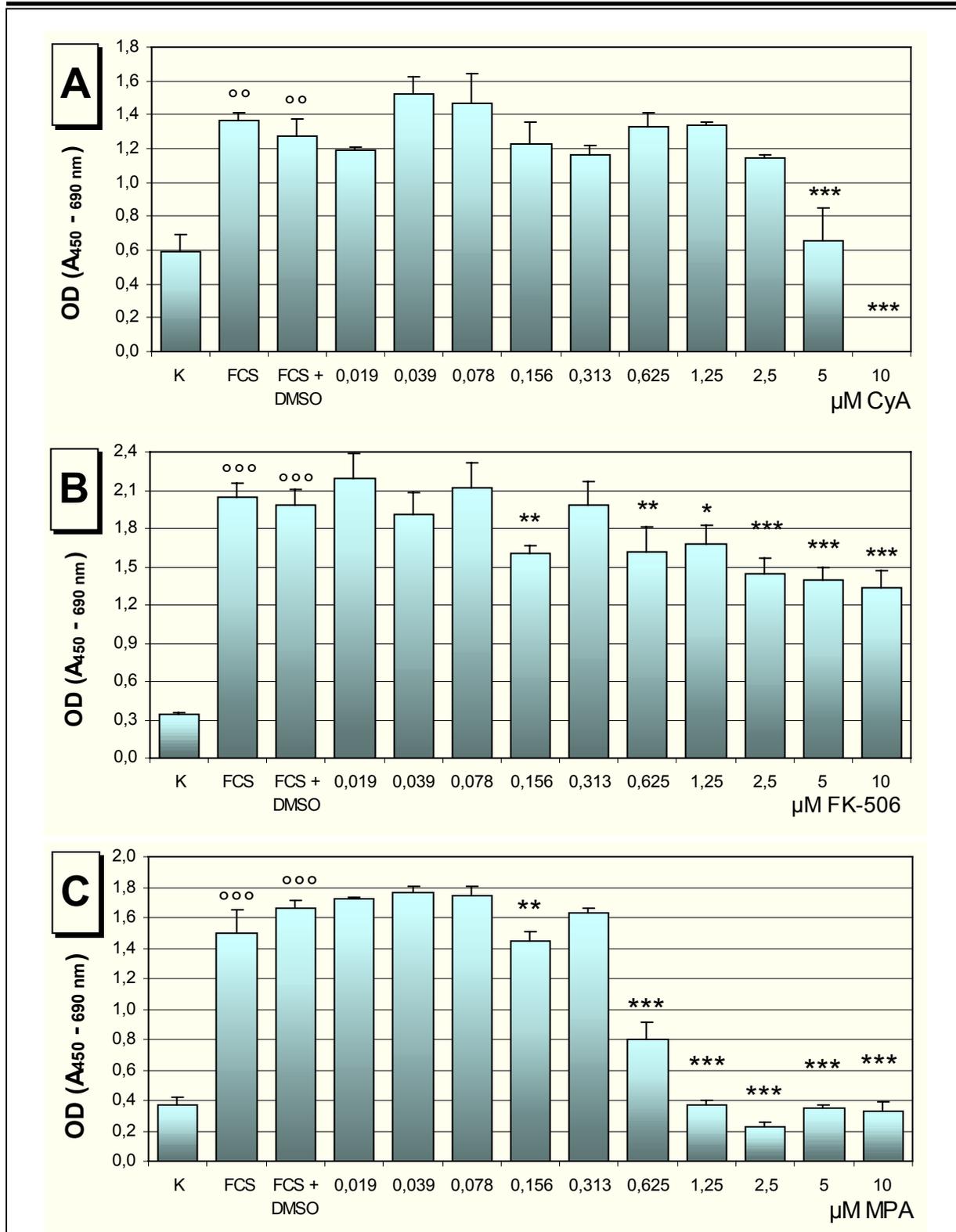


Abbildung 4-3: Einfluss von IS: CyA (A), FK-506 (B), MPA (C) auf DNA-Synthese von Mesangiumzellen. Subkonfluente Zellen wurden zum Zeitpunkt 0 mit 10% FCS stimuliert und gleichzeitig verschiedenen Konzentrationen von IS ausgesetzt. Nach 48 h Inkubation wurde über 2 h der BrdU-Einbau in die Zellen gemessen. ($n=6$, \pm SD), °° $P \leq 0,01$; °°° $P \leq 0,001$ vs. Kontrolle ohne FCS; * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$ vs. Kontrolle mit FCS und DMSO.

Die durch FCS gesteigerte BrdU- Einbaurrate blieb unter Zugabe von 0,1% DMSO unverändert.

Die DNA-Synthese wurde unter dem Einfluss von MPA am stärksten gehemmt. Die IC₅₀ von MPA lag bei $0,52 \pm 0,02 \mu\text{M}$. Ab Konzentration $0,625 \mu\text{M}$ war eine höchst signifikante ($p \leq 0,001$) Hemmung im Vergleich zur Kontrolle mit FCS und DMSO zu beobachten. Ab Konzentration $1,25 \mu\text{M}$ hemmte MPA vollständig den BrdU-Einbau, OD-Wert glich dem OD-Wert der unstimulierten Kontrolle.

Die IC₅₀ von CyA lag bei $2,75 \pm 0,14 \mu\text{M}$. Ab $5 \mu\text{M}$ gab es einen rapiden Abfall der Proliferationsrate ($p \leq 0,001$) und bei $10 \mu\text{M}$ lag der OD-Wert sogar unter dem OD-Wert der unstimulierten Kontrolle.

FK-506 reduzierte den BrdU-Einbau weniger stark, die Hemmung des BrdU-Einbaus ab $0,625 \mu\text{M}$ ist aber statistisch als signifikant ($p \leq 0,01$) anzusehen.

4.2.3 Einfluss von CyA, FK-506 oder MPA auf die Proliferation und Vitalität von Mesangiumzellen gemessen mittels MTT-Tests

Anhand des MTT-Tests (Abschnitt 3.3.3) konnten Proliferation und Vitalität der Zellen unter dem Einfluss von IS untersucht werden. Für diese Untersuchung wurden die Zellen zum Zeitpunkt 0 mit 10% FCS stimuliert und gleichzeitig mit den Medikamenten behandelt. Parallel wurde eine Gruppe der Zellen ohne FCS-Stimulierung (serumreduziertes Medium mit 0,5% FCS) nur mit den Medikamenten behandelt, um zu untersuchen, welche Wirkung die IS auf die Vitalität der nicht proliferierenden Mesangiumzellen ausüben, und ob eine mögliche Proliferations-hemmung auf die zytotoxische Wirkung der untersuchten Pharmaka zurückzuführen ist. Die Abbildung 4-4 zeigt exemplarisch die Ergebnisse eines MTT-Tests mit CyA.

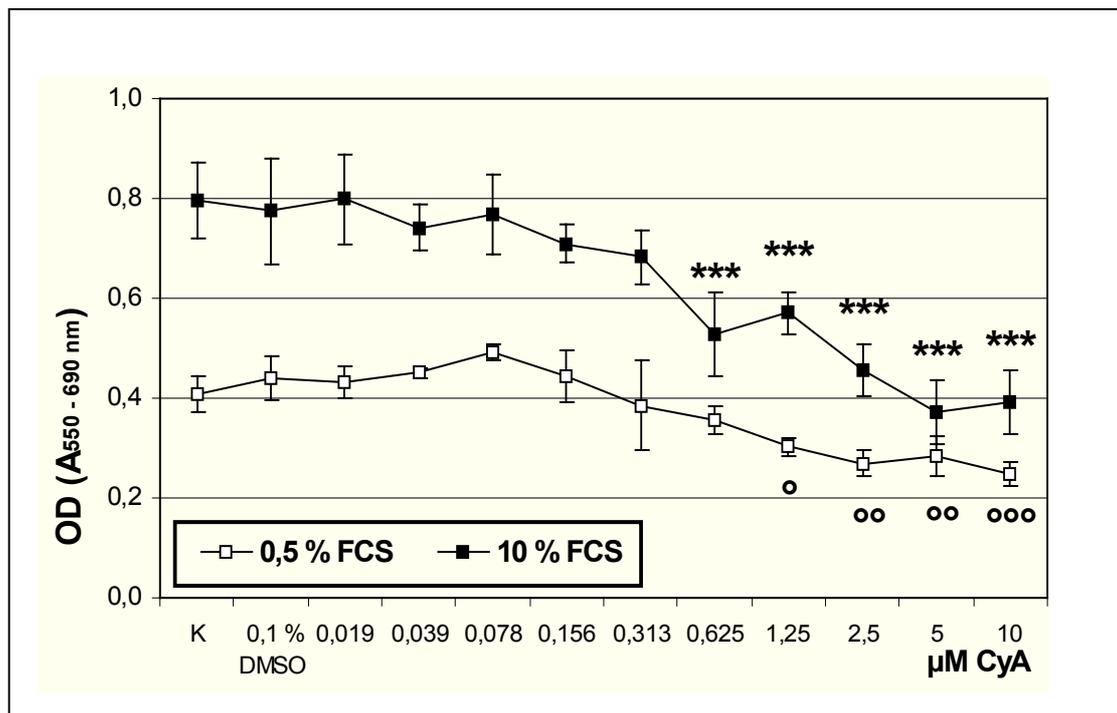


Abbildung 4-4: MTT-Test bei Mesangiumzellen nach der Behandlung mit CyA in einem Medium mit FCS (10%) oder in einem serumreduzierten (0,5% FCS) Medium. Nach einer 48 h Inkubation wurde die mitochondriale Aktivität der Zellen photometrisch gemessen. ($n=6 \pm SD$), ° $P \leq 0,05$; °° $P \leq 0,01$; °°° $P \leq 0,001$ vs. Kontrolle (0,5% FCS) mit DMSO; *** $P \leq 0,001$ vs. Kontrolle mit FCS (10% FCS) und DMSO.

MPA wies auch bei dieser Untersuchung schon ab 0,625 µM eine höchst signifikante ($p \leq 0,01$) Hemmung der Proliferation der Mesangiumzellen, wobei keine reduzierende Wirkung auf die Vitalität der Zellen zu beobachten war. Diese Ergebnisse sprachen für einen nicht toxischen antiproliferativen Effekt von MPA bei therapeutischen Dosierungen (diese Ergebnisse werden nicht aufgezeigt).

FK-506 zeigte eine signifikante ($p \leq 0,05$) wachstumshemmende Wirkung ab 0,625 µM, ohne dass die Vitalität der Zellen begrenzt wurde. Die Hemmung fand aber nicht im therapeutischem Bereich statt (diese Ergebnisse werden nicht aufgezeigt).

CyA demgegenüber wirkte ab 0,625 µM höchst signifikant ($p \leq 0,01$) wachstumshemmend, gleichzeitig aber nahm die Vitalität der nicht stimulierten Zellen unter dem Einfluss dieses Immunsuppressivums ab der Konzentration 1,25 µM stark und signifikant ab ($p \leq 0,05$). Dieser Befund deutet auf eine wachstumshemmende Wirkung von CyA, die mit nephrotoxischen Effekten verbunden ist.

4.2.4 Zytotoxische Wirkung von CyA, FK-506 oder MPA auf die Mesangiumzellen (LDH-Test)

Zusätzlich zu MTT-Test wurden die Zellen nach 24 h Inkubation mit untersuchten Konzentrationen der IS im Medium mit 1% FCS dem LDH-Test unterzogen (Abschnitt 3.3.4). Hierzu wurde die freigesetzte LDH, die als Marker für die Zellyse dient, im zellulären Überstand gemessen. Als 100% zytotoxisch (Kontrolle Maximum) galt eine 1% Triton-X-100-Lösung. Die Ergebnisse sind als OD Werte in der Abbildung 4-5 dargestellt und als % Zytotoxizität in Tab. 4-1 zusammengefasst.

Tabelle 4-1 Zytotoxizität (%) der IS. Die Zellen wurden 24 h mit Medikamenten im Medium mit 1% FCS inkubiert. Als Kontrolle Maximum (100% Zytotoxizität) dienten Zellen, die mit 1% Triton-X-100 inkubiert wurden. Kontrolle Minimum stellten Zellen, die nur mit Medium behandelt wurden, dar. ($n=6$, \pm SD), * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$ vs. Kontrolle mit DMSO.

Konzentration (μ M)	% Zytotoxizität		
	CyA	FK-506	MPA
0,019	4,37 \pm 0,11 *	4,98 \pm 0,26 **	0,49 \pm 0,03
0,039	0,64 \pm 0,07	6,57 \pm 0,79	0,43 \pm 0,03
0,078	5,31 \pm 0,13 *	5,57 \pm 0,23 ***	1,93 \pm 0,08
0,156	2,51 \pm 0,17	5,93 \pm 0,50 *	0,38 \pm 0,04
0,313	6,46 \pm 0,48 *	4,70 \pm 0,15 ***	2,96 \pm 0,38
0,625	6,77 \pm 0,15 **	7,32 \pm 0,91	-0,63 \pm 0,04
1,25	16,94 \pm 1,95 **	8,61 \pm 0,69 **	1,53 \pm 0,21
2,5	16,87 \pm 0,94 ***	8,39 \pm 0,65 **	-0,66 \pm 0,06
5	31,54 \pm 2,66 ***	19,59 \pm 2,38 **	3,57 \pm 0,40
10	28,63 \pm 1,29 ***	15,68 \pm 0,48 **	3,31 \pm 0,36

Bei allen LDH-Versuchen erwies sich 0,1% DMSO als nicht toxisch (Abbildung 4-5). Von den drei untersuchten IS wies CyA die stärkste Zytotoxizität auf die Mesangiumzellen. Bereits Konzentration von 1,25 μ m zeigte eine Toxizität von 16,94 \pm 1,95%, und ab 5 μ m lag die Toxizität bei 31,54 \pm 2,66%. Weniger toxisch wirkte FK-506, bei 1,25 μ m war die Toxizität 8,61 \pm 0,69% und bei 10 μ m 15,68 \pm 0,48%. Bei MPA war im untersuchten Konzentrationsbereich (0 - 10 μ m) keine signifikante Zytotoxizität nachweisbar.

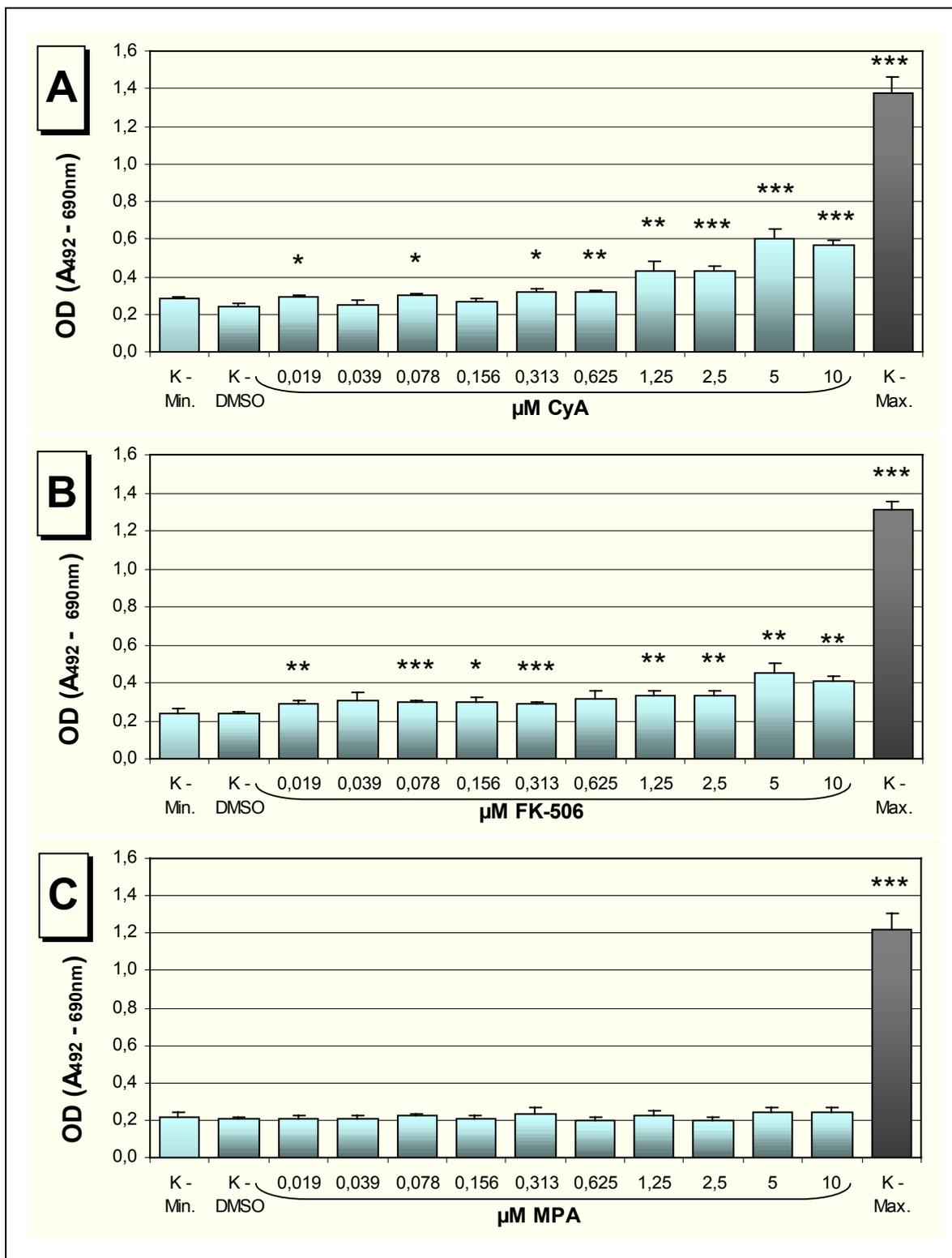


Abbildung 4-5: LDH-Freisetzung in mit IS: CyA (A), FK-506 (B), MPA (C) behandelten Mesangiumzellen. Die Zellen wurden 24 h mit Medikamenten im Medium mit 1% FCS inkubiert. Als Kontrolle Maximum dienten Zellen, die mit 1% Triton-X-100 inkubiert wurden. Kontrolle Minimum stellten Zellen, die nur mit Medium behandelt wurden, dar ($n=6$, \pm SD), * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$ vs. Kontrolle DMSO.

4.2.5 Zusammenfassung: Proliferationsversuche unter dem Einfluss von IS

Aus allen Proliferationsversuchen (BrdU-, MTT-Test und Zellzahlbestimmung) resultierte, dass nur MPA im therapeutischen Bereich auf die Mesangiumzellen effektiv antiproliferativ wirkte. Der LDH-Test zeigte, dass die proliferationshemmende Wirkung von MPA bis 10 μ M nicht toxisch ist. Hingegen war die inhibierende Wirkung von CyA mit toxischen Effekten verbunden. FK-506 stellte sich als weniger toxisches, aber für die MZ als nicht effektiv antiproliferatives Medikament dar.

4.2.6 Untersuchung der Genexpression von c-fos, Egr-1 und PDGF-B unter der Wirkung von MPA auf Mesangiumzellen mittels RT-PCR

Mit Hilfe der RT-PCR sollte untersucht werden, ob unter dem PDGF-BB die Mesangiumzellen c-fos, Egr-1 und PDGF-B exprimieren, und ob die Expression dieser Gene sich durch eine Behandlung mit MPA hemmen lässt.

Wie unter 3.7.3 beschrieben, wurde die aus den Rattenmesangiumzellen gewonnene RNA einer reversen Transkription und einer anschließenden PCR mit spezifischen Primern unterzogen. Die Expressionsstärke des Zielgens wurde auf die Expression des Referenzgens (GAPDH) bezogen, wodurch Expressionsunterschiede unter Stimulation mit PDGF-BB und der Behandlung mit MPA bestimmt werden konnten.

Einfluss von MPA auf Genexpression von "immediate early genes" c-fos und Egr-1

Sowohl c-fos als auch Egr-1 wurde nach der Stimulierung mit PDGF-BB induziert. Die Behandlung der Mesangiumzellen mit MPA führte schon nach 30 min zu Abschwächung der Egr-1-Gen-Expression. Demgegenüber wurde die mRNA-Expression von c-fos unter dem Einfluss von MPA erst nach 2 h gehemmt.

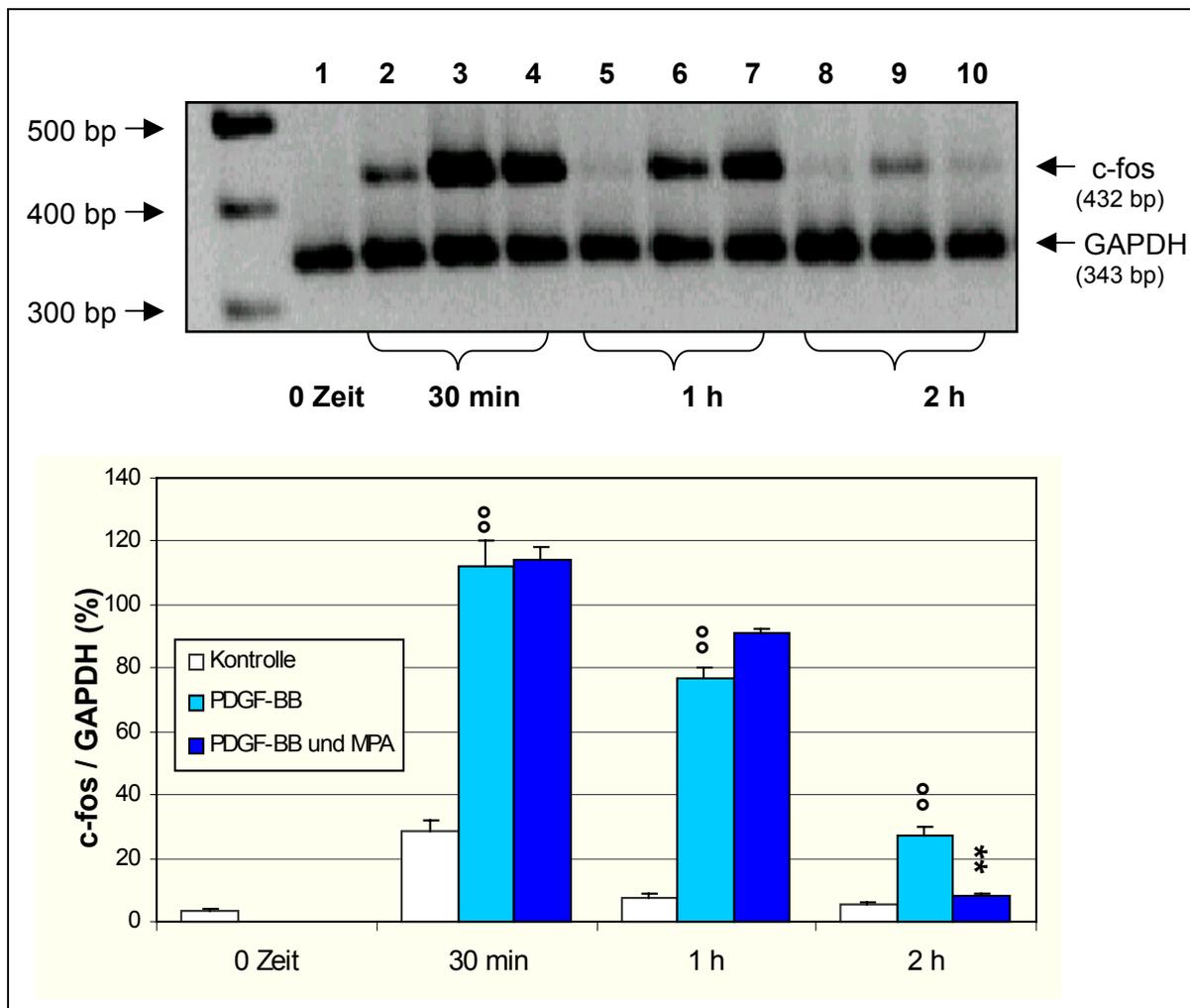


Abbildung 4-6: Genexpression von *c-fos* in einer Zeitkinetik bei Mesangiumzellen ohne oder nach Behandlung mit MPA. Wachstumsarretierte Zellen wurden mit 25 ng/ml PDGF-BB stimuliert und mit 2,5 μ M MPA behandelt. Die gewonnene RNA wurde einer RT-PCR mit GAPDH als Referenzgen unterzogen. Oben: Repräsentatives RT-PCR-Gel. Lane 1, 2, 5, 8: Kontrolle (mit 0,5% FCS und Vehikel); Lane 3, 6, 9: PDGF-BB (mit Vehikel); Lane 4, 7, 10: PDGF-BB und MPA. Unten: Densitometrische Auswertung der PCR-Produkte. Die Grafik zeigt Mittelwerte \pm SD aus zwei Zellpräparationen, wobei von jedem Einzelexperiment 3 RT-PCR durchgeführt wurden. °° $P \leq 0,01$ vs. Kontrolle; ** $P \leq 0,01$ vs. PDGF-BB

Die Expression der mRNA von *c-fos* (Abb. 4-6) ließ sich schon durch 0,5% FCS induzieren, eine sehr starke und signifikante ($p \leq 0,01$) Genexpression erfolgte unter einer Stimulierung mit PDGF-BB (25 ng/ml). Diese war 30 min nach der Stimulation maximal (Spur 3), nach 2 h (Spur 9) noch signifikant nachweisbar ($p \leq 0,01$). Nach 4 Stunden konnte *c-fos* nicht mehr nachgewiesen werden. Ein hemmender Effekt von MPA auf *c-fos* konnte bis zu 1 h nach PDGF-BB-Stimulierung nicht festgestellt werden, erst nach 2 h wurde eine signifikante ($p \leq 0,01$) Abschwächung der *c-fos* Expression (Spur 10) gegenüber der mit PDGF-BB stimulierten Probe erkennbar.

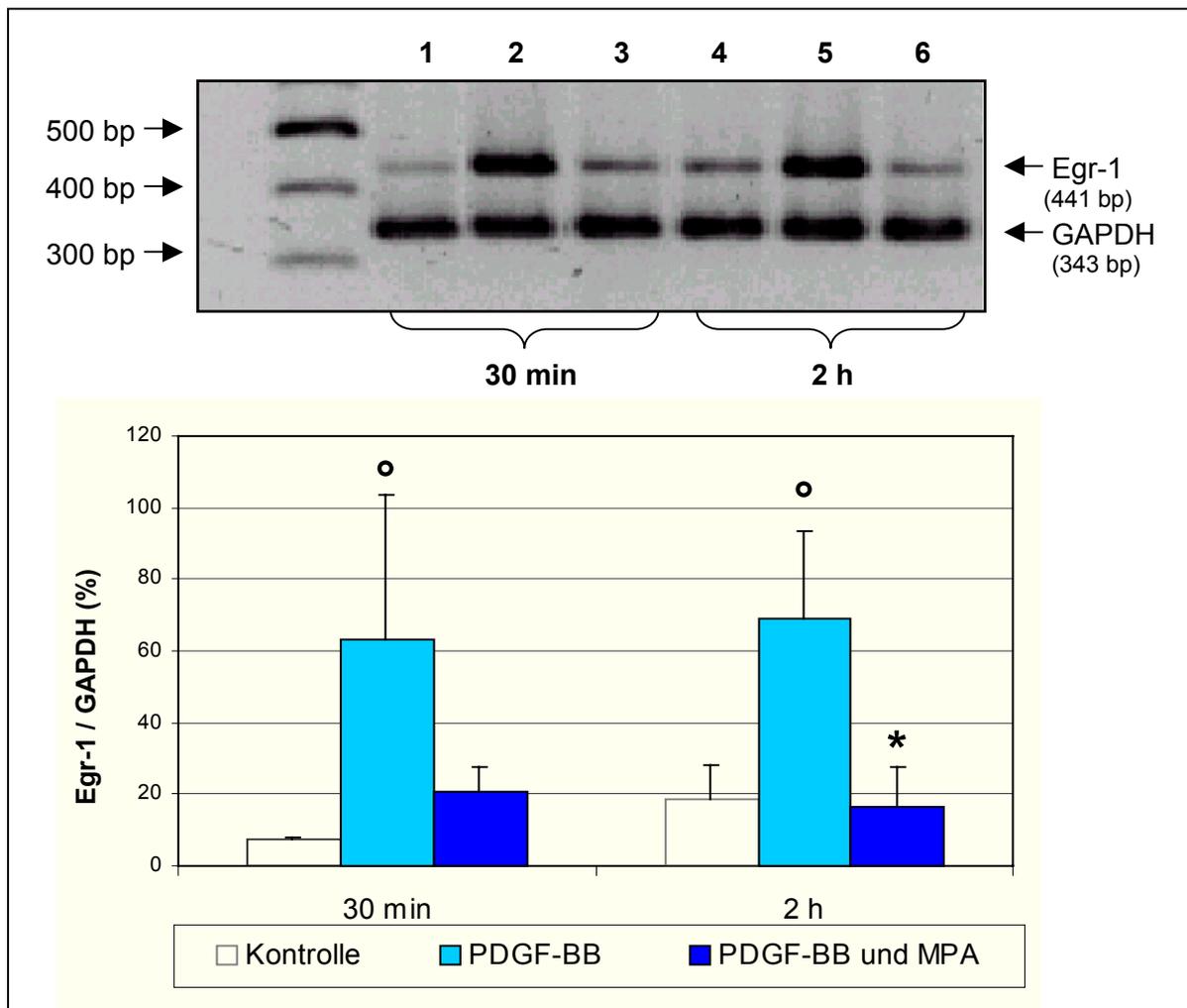


Abbildung 4-7: *Egr-1-Genexpression in Mesangiumzellen ohne oder nach Behandlung mit MPA. Die c-DNA-Proben stammen von Mesangiumzellen, die zum Zeitpunkt 0 (nach Zellsynchronisierung) mit 25 ng/ml PDGF-BB stimuliert und mit 2,5 μM MPA behandelt wurden. Oben: Repräsentatives RT-PCR-Gel. Lane 1, 4: Kontrolle (mit 0,5% FCS und Vehikel); Lane 2, 5: PDGF-BB (mit Vehikel); Lane 3,6: PDGF-BB und MPA. Unten: Densitometrische Auswertung der PCR-Produkte. Die Grafik zeigt Mittelwerte ± SD aus zwei Zellpräparationen, wobei von jedem Einzelexperiment 3 RT-PCR durchgeführt wurden. ° $P \leq 0,05$ vs. Kontrolle; * $P \leq 0,05$ vs. PDGF-BB*

Egr-1-mRNA „steady state-level“ (Abb.4-7) waren bereits 30 min nach einer Inkubation mit 0,5% FCS (Spur1) nachweisbar. Unter dem Einfluss von PDGF-BB (25 ng/ml, Spur 2) wurde die Egr-1-mRNA -Expression in Bezug auf die unstimulierte Kontrolle signifikant stärker ($p \leq 0,05$). Die durch PDGF-BB induzierte Egr-1-Expression wurde durch MPA bereits 30 min nach Stimulation (Spur 3) gehemmt, dieser Effekt erhielt sich auch nach 2 h (Spur 6) gegenüber der mit PDGF-BB stimulierten Probe (Spur 5) signifikant ($p \leq 0,05$). 4 h nach der PDGF-BB-Stimulation war die Egr-1-Expression nicht mehr nachweisbar.

Einfluss von MPA auf Genexpression von PDGF-B

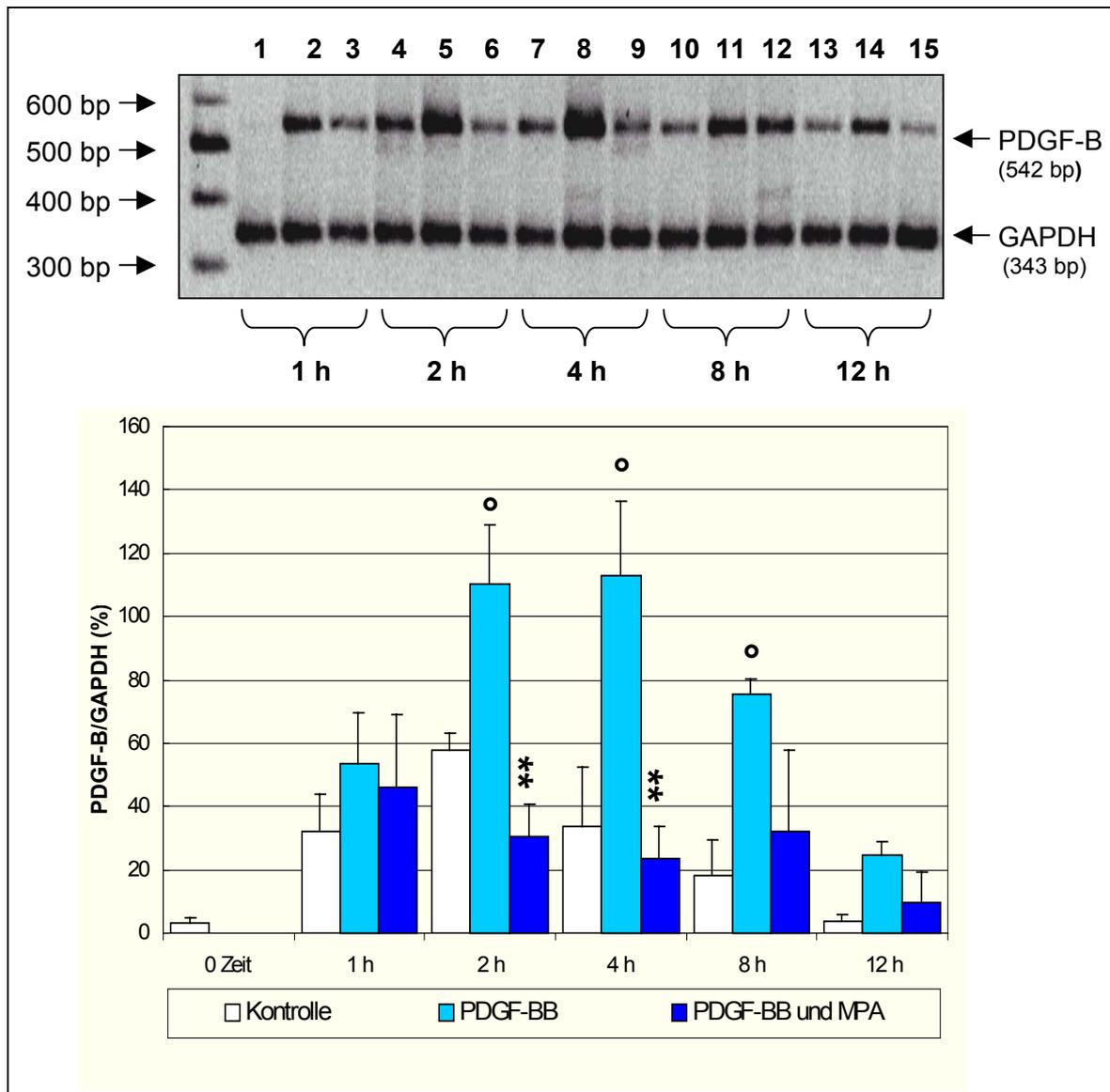


Abbildung 4-8: PDGF-B-Genexpression in einer Zeitkinetik in Mesangiumzellen ohne oder nach Behandlung mit MPA. Wachstumsarretierte Zellen wurden mit 25 ng/ml PDGF-BB stimuliert und mit 2,5 μ M MPA behandelt. Die gewonnene RNA wurde einer RT-PCR mit GAPDH als Referenzgen unterzogen. Oben: Repräsentatives RT-PCR-Gel. Lane 1, 4, 7, 10, 13: Kontrolle (mit 0,5% FCS und Vehikel); Lane 2, 5, 8, 11, 14: PDGF-BB (mit Vehikel); Lane 3, 6, 9, 12, 15: PDGF-BB und MPA. Unten: Densitometrische Auswertung der PCR-Produkte. Die Grafik zeigt Mittelwerte \pm SD aus zwei Zellpräparationen, wobei von jedem Einzellexperiment 3 RT-PCR durchgeführt wurden. ° $P \leq 0,05$ vs. Kontrolle; ** $P \leq 0,01$ vs. PDGF-BB.

Die in der Abb. 4-8 dargestellte Genexpression von PDGF-B ließ sich durch PDGF-BB mit einem Maximum bei 2 h (Spur 5) und 4 h (Spur 8) signifikant ($p \leq 0,05$) induzieren. Diese Beobachtung bestätigte, dass die Stimulation von

Mesangiumzellen mit PDGF-BB zu einer Hochregulierung der PDGF-B-mRNA im Zuge einer autokrinen Verstärkung führt. Die Behandlung der Mesangiumzellen mit 2,5 μ M MPA führte bei allen Zeitpunkten zu einer Hemmung der durch PDGF-BB induzierten PDGF-B-Genexpression und diese war bei 2 und 4 h (Spur 6 und 9) signifikant ($p \leq 0,01$).

4.2.7 Untersuchung von Transkriptionsfaktor AP-1 nach der Behandlung mit MPA (EMSA)

Um zu überprüfen, ob MPA den durch PDGF-BB aktivierten Transkriptionsfaktor AP-1 beeinflussen kann, wurden Kernproteine aus Mesangiumzellen nach einer bestimmten Behandlung in ein "electrophoretic mobility shift assay" (EMSA) eingesetzt. Hierzu wurde eine Oligonukleotid-Sonde mit einer Consensussequenz, an die der AP-1 c-Jun Homodimer und Jun/Fos Heterodimer Komplex bindet, verwendet (Abschnitt 3.9.1). Die Abbildung 4-9 gibt das Ergebnis des EMSA wieder.

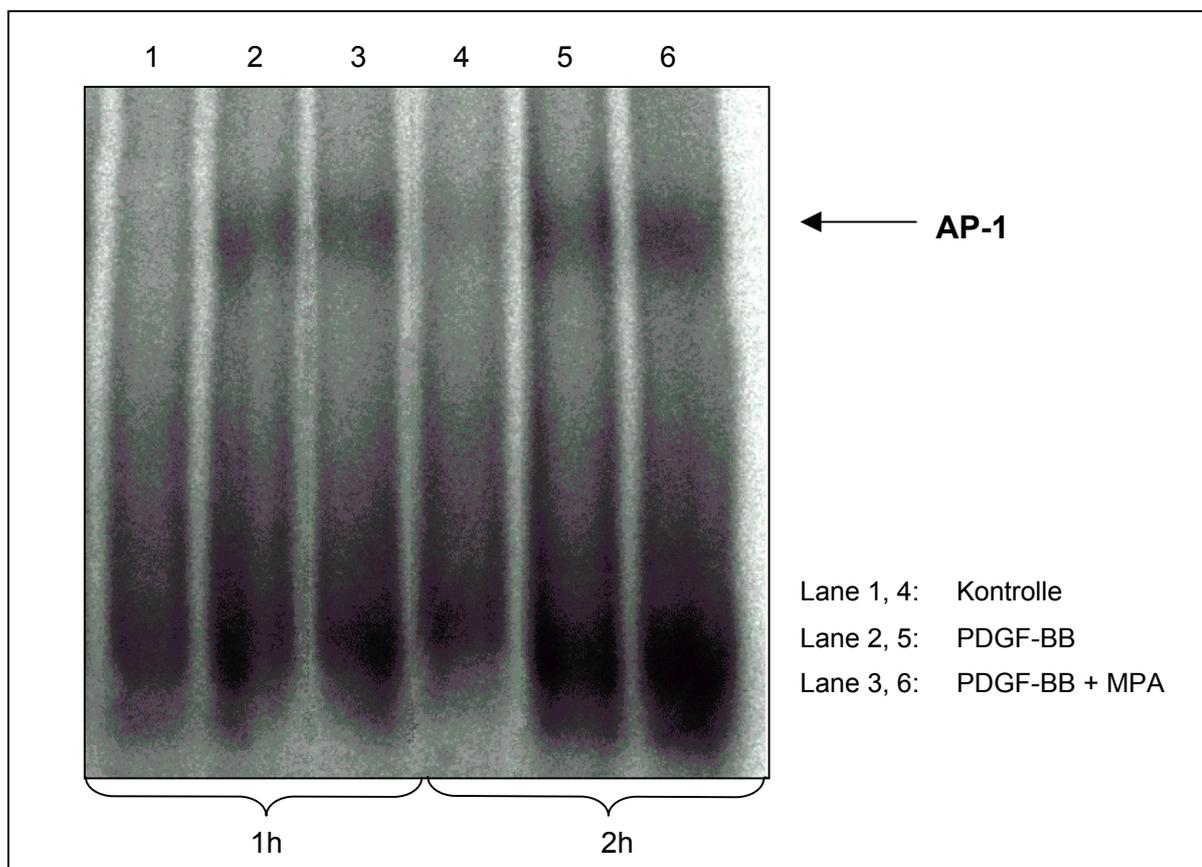


Abbildung 4-9: Electrophoretic Mobility Shift Assay zur Untersuchung des Einflusses von MPA auf den durch PDGF-BB aktivierten Transkriptionsfaktor AP-1. Kernproteine von Mesangiumzellen (5 µg je Lane), die 1h und 2 h mit 25 ng/ml PDGF-BB stimuliert und ohne oder mit 2,5 µM MPA vorinkubiert worden waren, wurden mit dem spezifischen [γ 32 P] - markierten Oligonukleotid für c-jun hybridisiert, die Hybride mittels PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie detektiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass AP-1 durch PDGF-BB nach 1 h und 2 h aktiviert wurde. Nach der PDGF-BB-Stimulierung ergaben sich charakteristische Bindungskomplexe der DNA-Sonde mit AP-1 der Kernproteine. Der durch PDGF-BB aktivierte AP-1 wurde in der untersuchten Zeit 1 und 2 h nach Stimulierung unter MPA nicht beeinflusst.

4.2.8 Einfluss von MPA auf PDGF-BB- und PDGFR β -Proteinexpression von Mesangiumzellen

Im Abschnitt 4.2.6 wurde gezeigt, dass MPA die durch PDGF-BB induzierte PDGF-B Genexpression hemmen konnte.

Mit Hilfe eines Antikörpers gegen PDGF-B wurde im Western - Blot - Verfahren untersucht, ob MPA die durch FCS (10%) stimulierte PDGF-B - Proteinexpression beeinflusst. Schließlich wurde auch in demselben Verfahren mit einem Antikörper gegen den Rezeptor PDGFR- β geprüft, ob nach der FCS - Stimulation die Zellen verstärkt PDGFR- β exprimieren, und ob ein Effekt unter dem Einfluss von MPA auftritt.

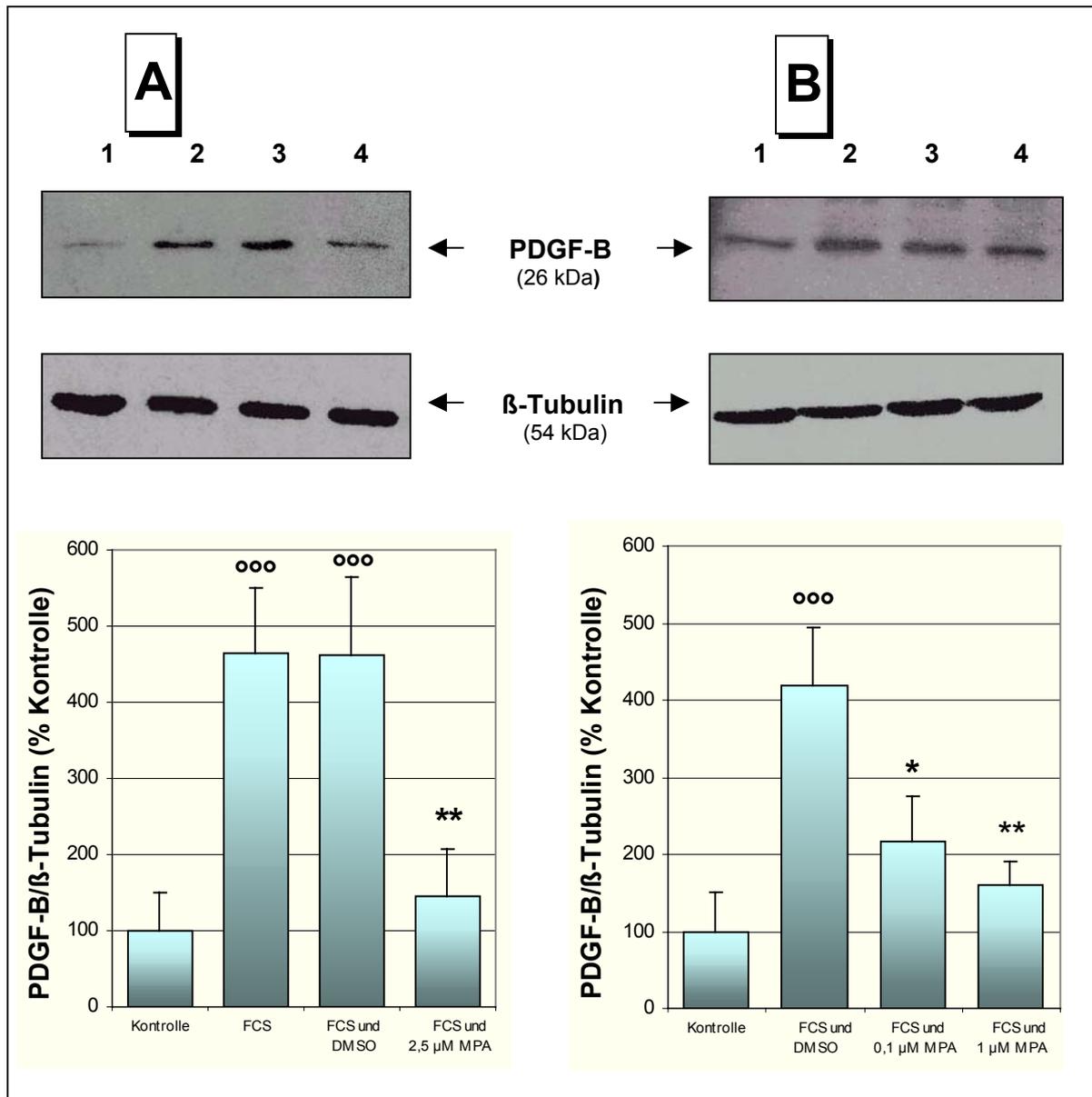


Abbildung 4-10: Einfluss von MPA auf PDGF-B Proteinexpression in Mesangiumzellen. Lysate (je 15 μg Protein/Lane) von Kontrollzellen (0,5% FCS) oder mit 10% FCS stimulierten ohne oder mit MPA behandelten Zellen wurden in einem 15%-igen SDS-Gel aufgetrennt und auf PVDF-Membran geblottet. Die Detektion erfolgte mit einem anti-PDGF-B-Antikörper und einer nachgeschalteten ECL-Reaktion. Die Proteinexpression von PDGF-B wurde densitometrisch ausgewertet und auf die Expression eines internen Referenzproteins (β -Tubulin) bezogen. *A-Oben:* Repräsentativer Western-Blot, Lane 1: Kontrolle, Lane 2: FCS, Lane 3: FCS + Vehikel, Lane 4: FCS + 2,5 μM MPA. *B-Oben:* Repräsentativer Western-Blot, Lane 1: Kontrolle, Lane 2: FCS + Vehikel, Lane 3: FCS + 0,1 μM MPA, Lane 4: FCS + 1 μM MPA. *Unten:* Densitometrische Analysen von Blot A und B. Die Signalstärken sind als % Kontrolle (0,5% FCS) angegeben und stellen die Mittelwerte aus drei Experimenten \pm SD, dar. *** $P \leq 0,001$ vs. Kontrolle; * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$ vs. FCS mit Vehikel.

Die Quantifizierung der detektierten Signale (Abb. 4-10) ergab, dass schon 0,5% FCS (Kontrolle, Spur 1A) eine PDGF-B Proteinexpression induzierte. Im Vergleich zu dieser Kontrolle wurde die Bandenintensität durch FCS (10%, Spur 2A) signifikant ($p \leq 0,001$) verstärkt. Auch bei diesen Experimenten zeigte MPA schon ab 0,1 μM (Spur 3B) eine signifikante ($p \leq 0,05$) hemmende Wirkung auf die PDGF-B Proteinexpression, welche dosisabhängig zunahm und bei 2,5 μM MPA (Spur 4A) zu einer der unstimulierten Kontrolle entsprechenden Suppression von PDGF-B führte ($p \leq 0,01$). Somit stimmen die Ergebnisse von Western-Blot mit den von RT-PCR erhaltenen Beobachtungen sehr gut überein (Abb. 4-8).

Die Proteinexpression von PDGFR- β in Mesangiumzellen wurde durch eine Stimulation mit 10% FCS um 40% verstärkt, wobei die PDGFR- β Proteinexpression schon unter 0,5% FCS in der Kontrolle induzierbar war. Die Behandlung der Zellen mit MPA (0,1 μM und 1 μM) führte zu keiner signifikanten Änderung der Expression des PDGFR- β Proteins (diese Ergebnisse werden nicht aufgezeigt).

4.3 Untersuchung der Proliferation von Mesangiumzellen unter dem Einfluss von einem ACE-Hemmer und einem AT1-Rezeptorblocker

4.3.1 Bestimmung der zytotoxischen Wirkung von Ramiprilat und Valsartan auf die Mesangiumzellen (LDH-Test)

Weder Ang II, mit und ohne Vehikel (NaOH oder Ethanol), noch Ramiprilat und Valsartan zeigten toxische Wirkung. Die Abbildung 4-11 stellt exemplarisch die Ergebnisse der LDH-Bestimmung dar.

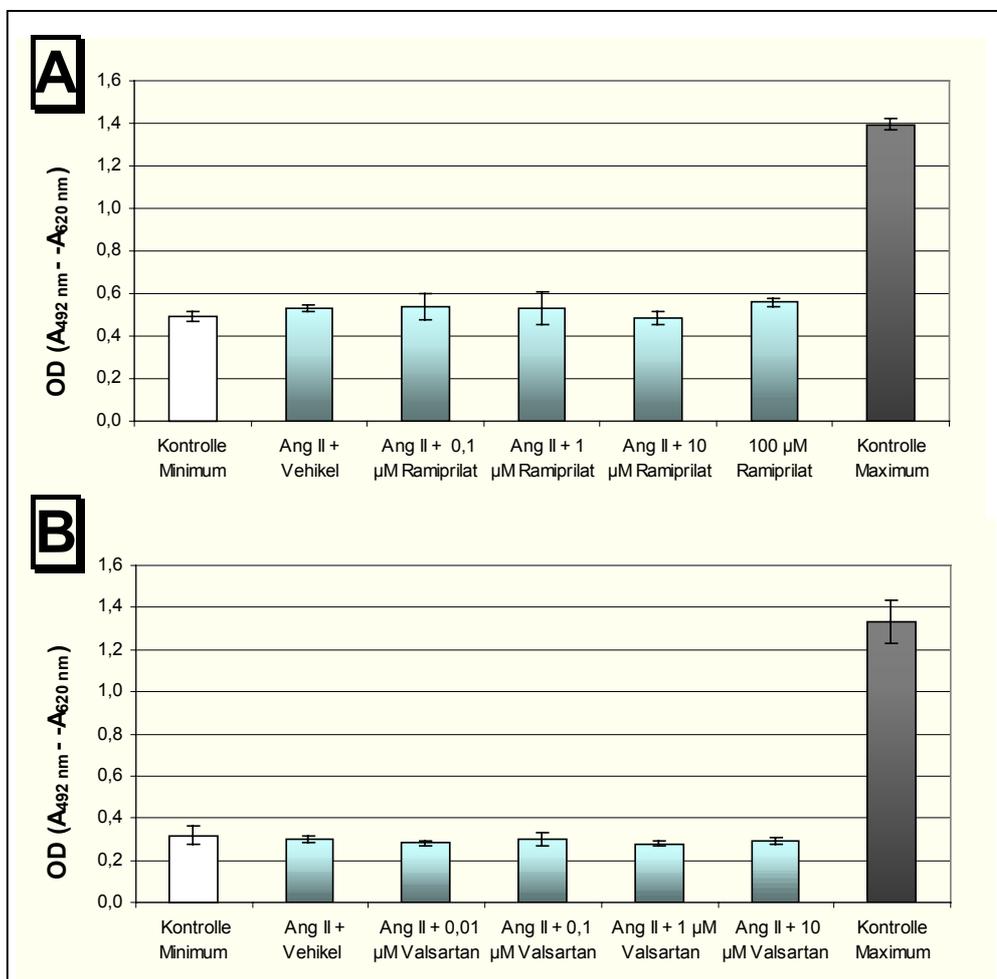


Abbildung 4-11: LDH-Test bei Mesangiumzellen, die mit Ang II (10 µM) stimuliert und mit Ramiprilat (A) oder Valsartan (B) behandelt wurden. Wachstumsarretierte Mesangiumzellen wurden mit Ang II stimuliert und der Wirkung von Ramiprilat oder Valsartan ausgesetzt. Nach 72 h Inkubation wurden die Zellen dem LDH-Test unterzogen. Als Kontrolle Maximum dienen Zellen, die mit 1% Triton-X-100 inkubiert wurden. Kontrolle Minimum stellen Zellen, die nur mit Medium inkubiert wurden, dar, (n=6, ± SD).

Keine der untersuchten Konzentrationen von Ang II (0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M) mit oder ohne Vehikel übte einen Effekt auf die LDH-Freisetzung (Ergebnisse nur für die höchste Konzentration aufgezeigt) aus, die OD-Werte gleichen der Kontrolle Minimum (Zellen die nur mit Medium ohne Medikament inkubiert wurden).

Sowohl Ramiprilat als auch Valsartan zeigten im untersuchten Konzentrationsbereich keinerlei toxische Wirkung, die LDH-Konzentrationen lagen im Bereich der Kontrolle Minimum (s. o.), was daraufhin deutet, dass die Vitalität der Zellen unter dem Einfluss von beiden Pharmaka unverändert blieb.

4.3.2 Proliferation der MZ nach Stimulation mit FCS und der Behandlung mit Ramiprilat oder Valsartan

Die DNA-Synthese der mit FCS stimulierten Mesangiumzellen wurde weder durch Ramiprilat noch durch Valsartan beeinflusst.

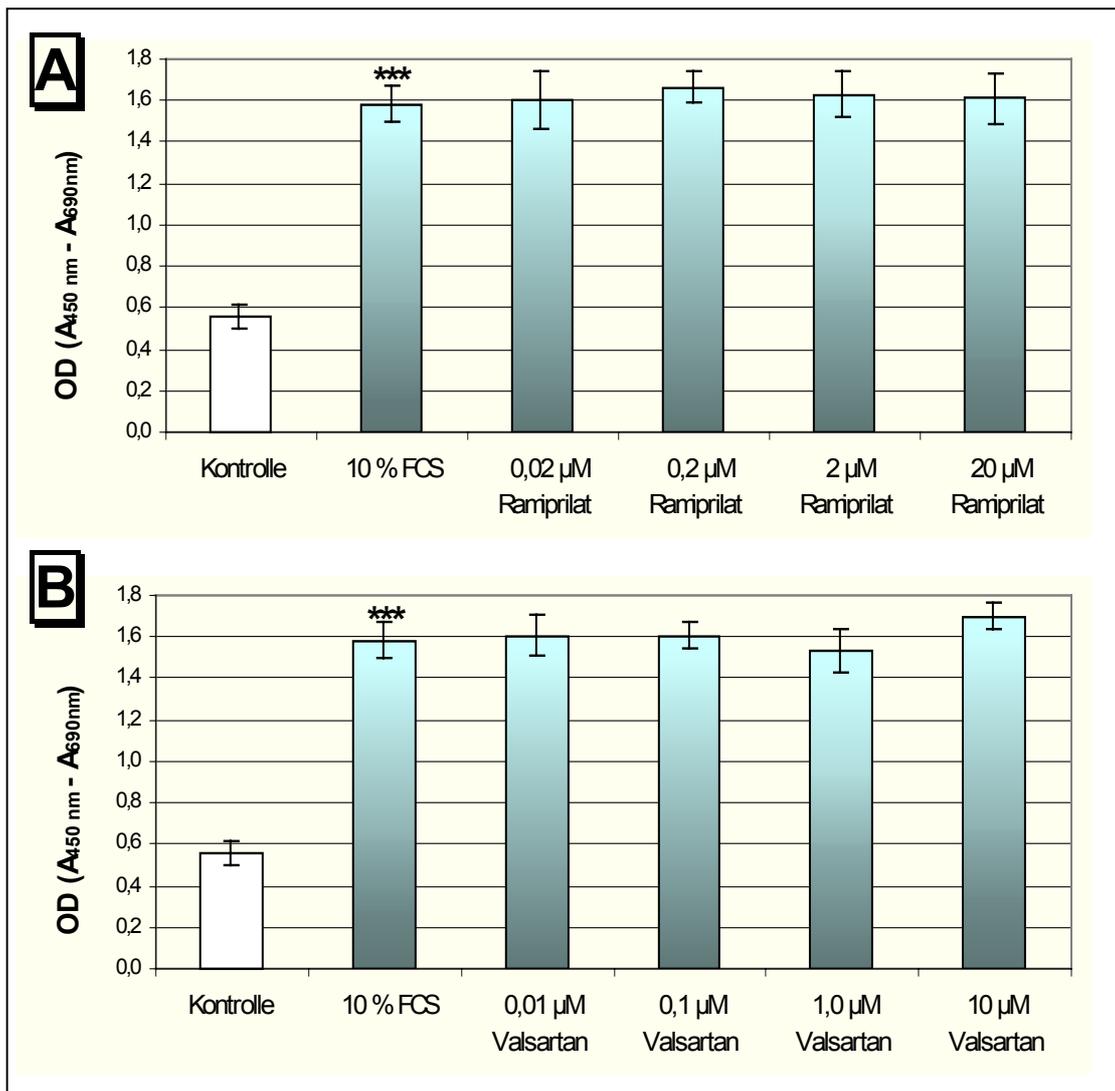


Abbildung 4-12: Einfluss von Ramiprilat (A), Valsartan (B) auf die Proliferation von Mesangiumzellen. Die Zellen wurden zum Zeitpunkt 0 (24 h wachstumsarretiert) mit 10% FCS stimuliert und gleichzeitig mit verschiedenen Konzentrationen von Ramiprilat oder Valsartan über 48 h behandelt. Gemessen wurde BrdU-Einbau in die DNA der Zellen nach 4 h (n=6, ± SD), *** P ≤ 0,001 vs. Kontrolle (mit 0,5% FCS).

Abb. 4-12 zeigt, dass die unter FCS stark gesteigerte BrdU-Einbaurrate durch keine der untersuchten Konzentrationen von Ramiprilat oder Valsartan gehemmt wurde.

Eine Untersuchung des Wachstumsverhaltens der Mesangiumzellen nach Behandlung mit Ramiprilat oder Valsartan im MTT-Test erbrachte dieselben Ergebnisse wie der BrdU-Assay (Ergebnisse werden nicht aufgezeigt), das heißt das mit FCS (und auch mit PDGF-BB oder IL-1 β) induzierte Wachstum der Mesangiumzellen wurde durch keins der beiden Medikamente verändert.

4.3.3 Proliferation der MZ nach Stimulation mit Ang II und der Behandlung mit Ramiprilat oder Valsartan

Wurden die Zellen mit Angiotensin II über 48 h inkubiert, konnte auch keine Zunahme der DNA-Synthese gemessen werden. Erst eine Inkubation mit Ang II über längere Zeit (3 oder 5 Tage) führte zu einer geringen, aber signifikanten Erhöhung der BrdU-Einbaurate (Abb. 4-13).

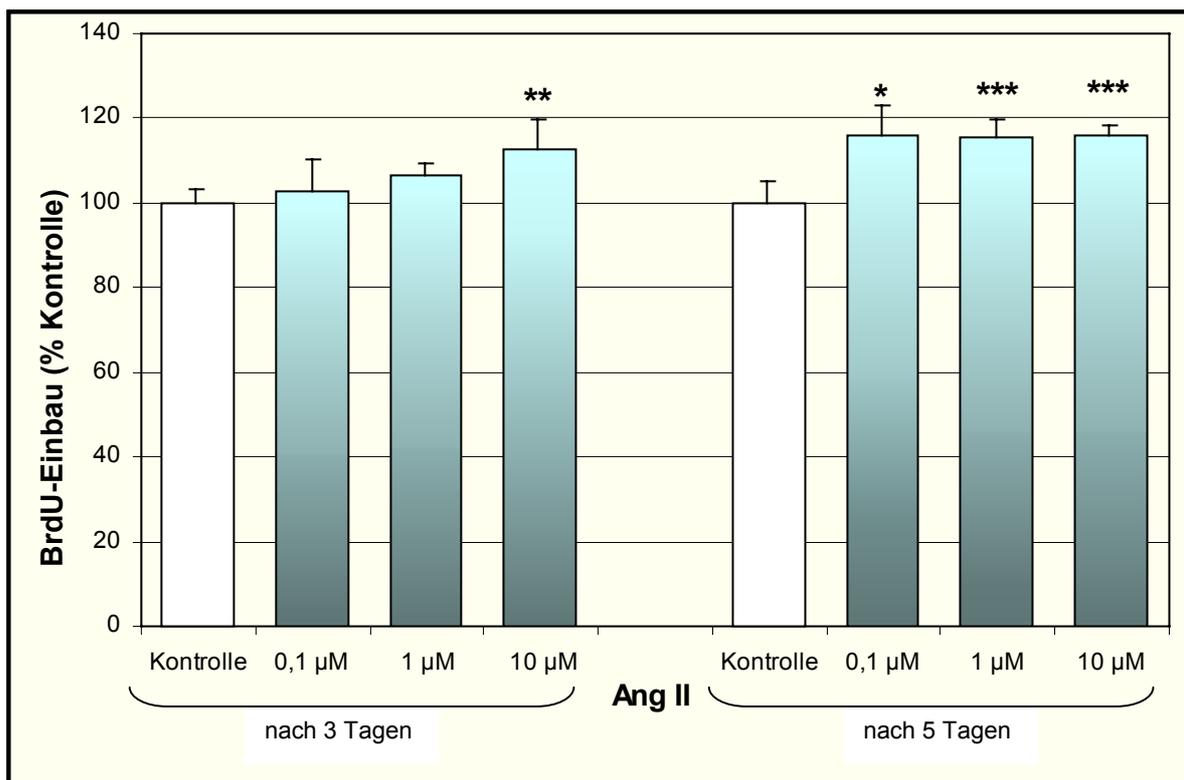


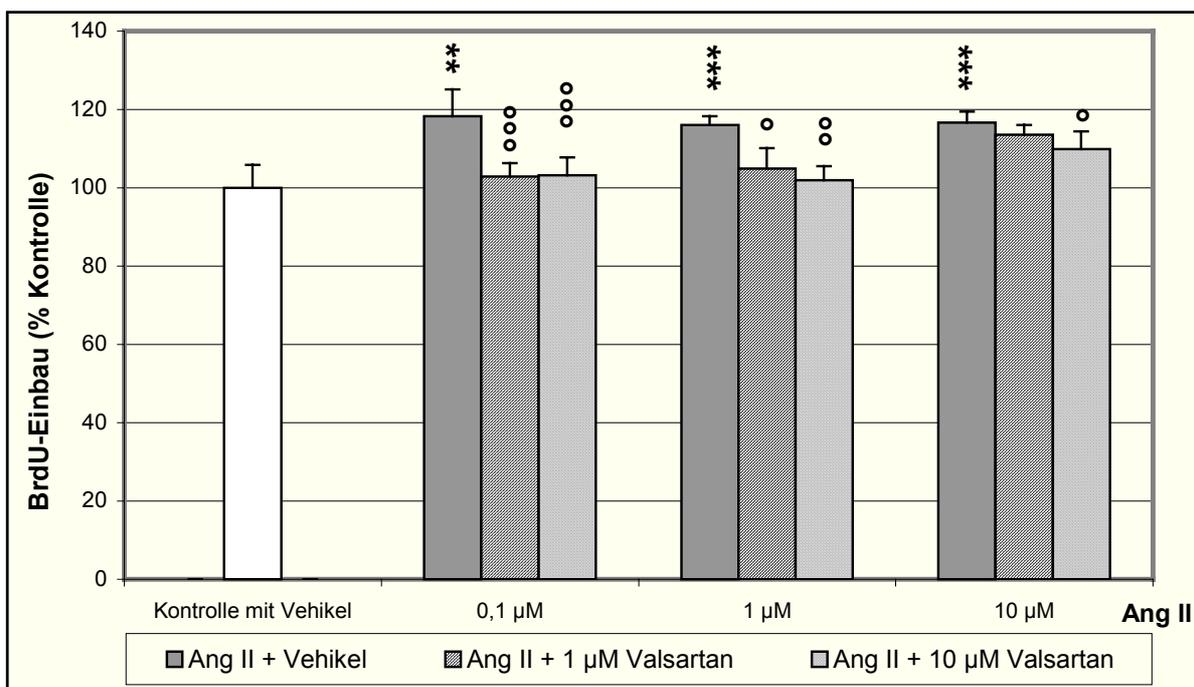
Abbildung 4-13: DNA-Synthese von Mesangiumzellen nach Stimulation mit Ang II. Wachstumsarretierte Zellen wurden mit Ang II (0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M) 3 und 5 Tage inkubiert. Gemessen wurde BrdU-Einbau in die DNA der Zellen nach 18 h ($n=6$, \pm SD), * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$ vs. unstimulierte Kontrolle.

Eine signifikant erhöhte DNA-Synthese fand schon 3 Tage nach der Inkubation der Zellen mit 10 μM Ang II statt, und nach 5 Tagen stimulierten alle untersuchten Ang II-Konzentrationen die DNA-Synthese signifikant.

Behandlung mit Ramiprilat oder Valsartan

Die Wirkung von Ang II wurde durch Behandlung mit dem ACE-Hemmer Ramiprilat nicht beeinflusst (Ergebnisse werden nicht aufgezeigt), während die Behandlung der Mesangiumzellen mit dem AT1-Rezeptor-Antagonist Valsartan zu einer Abschwächung der Ang II-Wirkung nach drei und fünf Tagen des Versuchs führte.

Die Abbildung 4-14 zeigt exemplarisch die Angiotensin II-Wirkung mit jeweiliger



Behandlung von 1 μM und 10 μM Valsartan 5 Tage nach der Stimulation.

Abbildung 4-14: Einfluss von Valsartan auf die durch Ang II stimulierte Proliferation von Mesangiumzellen. Die Zellen wurden zum Zeitpunkt 0 (24 h wachstumsarretiert) mit Ang II (0,1 μM , 1 μM , 10 μM) stimuliert und gleichzeitig mit Valsartan (1 μM und 10 μM) behandelt. Nach 5 Tagen wurde der BrdU-Einbau (18 h) in die DNA der Zellen gemessen ($n=6$, \pm SD). ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$ vs. Kontrolle mit Vehikel; ° $P \leq 0,05$; °° $P \leq 0,01$; °°° $P \leq 0,001$ vs. Ang II mit Vehikel.

Der ACE-Hemmer Ramiprilat zeigte keine Wirkung auf die mit Ang II stimulierten Zellen, demgegenüber wies der AT1-Rezeptor-Antagonist Valsartan (1 μM und 10 μM) eine signifikante Reduzierung des BrdU-Einbaus bei mit 0,1 μM und 1 μM

Ang II stimulierten Zellen auf, die BrdU-Einbaurrate erreichte das Niveau der unstimulierten Kontrolle. Die durch 10 μM Ang II induzierte DNA-Synthese wurde nur mit 10 μM Valsartan weniger, aber signifikant gehemmt.

Zellzahlbestimmung nach einer Behandlung mit Ramiprilat oder Valsartan

Unter der Wirkung von Ang II wurde eine signifikante Zellzahlabnahme gemessen. Keine Änderungen des Wachstumsverhaltens von MZ wurden nach der Behandlung mit dem ACE-Hemmer Ramiprilat festgestellt. Hingegen konnte der AT1-Rezeptorblocker Valsartan den durch Ang II ausgelösten Effekt beeinflussen (Abb. 4-15).

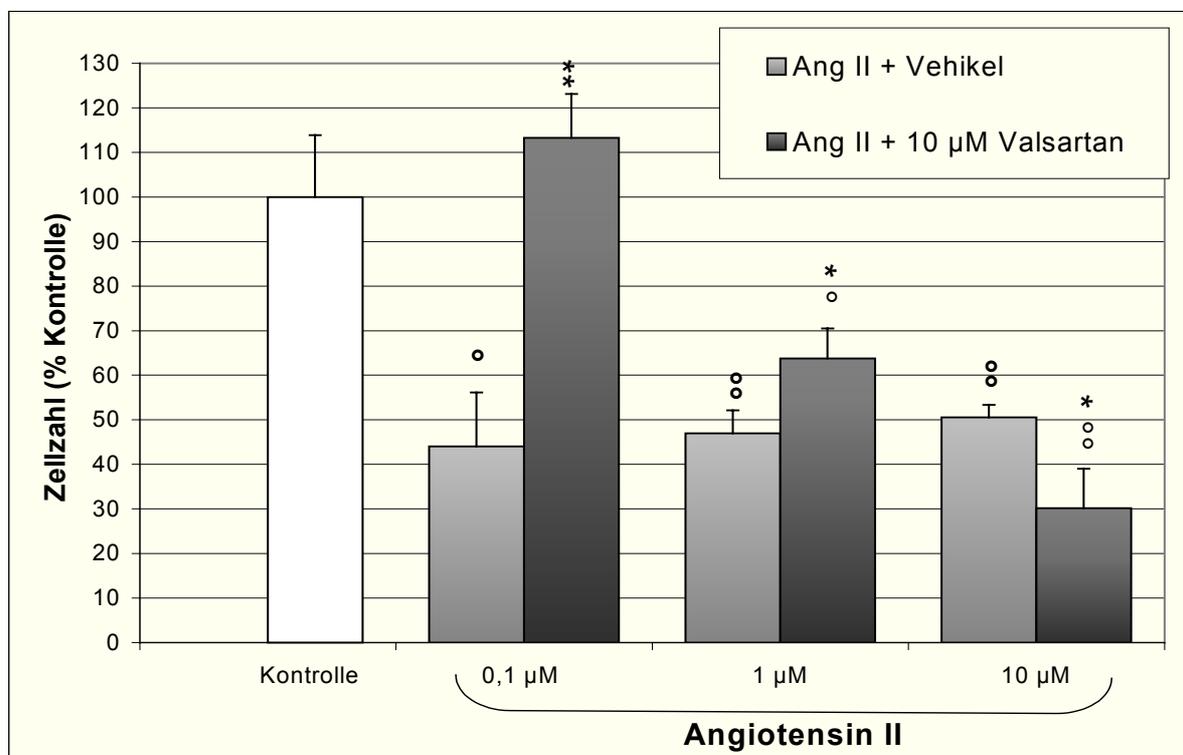


Abbildung 4-15: Zellzahlbestimmung nach der Behandlung mit Valsartan und einer Stimulation mit Ang II. Subkonfluente wachstumsarretierte Zellen waren mit Valsartan (10 μM) vorbehandelt worden, bevor die Stimulation mit Angiotensin II (0,1; 1 oder 10 μM) stattfand. Nach 4 Tagen Inkubation wurde die Zellzahl im Trypanblau-Test bestimmt. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert aus drei Versuchsansätzen dar ($n=3$, \pm SD). ° $P \leq 0,05$; °° $P \leq 0,01$ vs. Kontrolle; * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$ vs. Ang II + Vehikel.

4 Tage nach der Inkubation der Zellen mit Valsartan glich die Zellzahl der mit 0,1 μM Ang II stimulierten Zellen der unstimulierten Kontrolle und war signifikant höher im Vergleich zu Proben ohne Medikament ($p \leq 0,01$). Auch bei Proben, die mit 1 μM

Ang II stimuliert wurden, wurde unter Valsartan eine höhere Zellzahl gemessen ($p \leq 0,05$), die jedoch im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle signifikant niedriger war ($p \leq 0,05$). Mit steigenden Konzentrationen von Ang II nahm der gegen Ang II - wirkende Effekt von Valsartan ab. Die Blockade des AT1-Rezeptors mit Valsartan bei Zellen, die der Wirkung von 10 μM Ang II ausgesetzt worden waren, resultierte in einer signifikanten Reduktion der Zellzahl sowohl im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle ($p \leq 0,01$) als auch zu mit Ang II stimulierten Proben ($p \leq 0,05$).

4.3.4 Untersuchung der Hypertrophie

4.3.4.1 Proteingehaltsbestimmung nach Stimulation mit Ang II

Der Quotient von Gesamtprotein und Zellzahl ergab die durchschnittliche Proteinmenge einer Zelle. Dies diente zur Bestimmung der Zellhypertrophie.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Ang II hypertrophiefördernd auf die Mesangiumzellen wirkt (Abbildung 4-16).

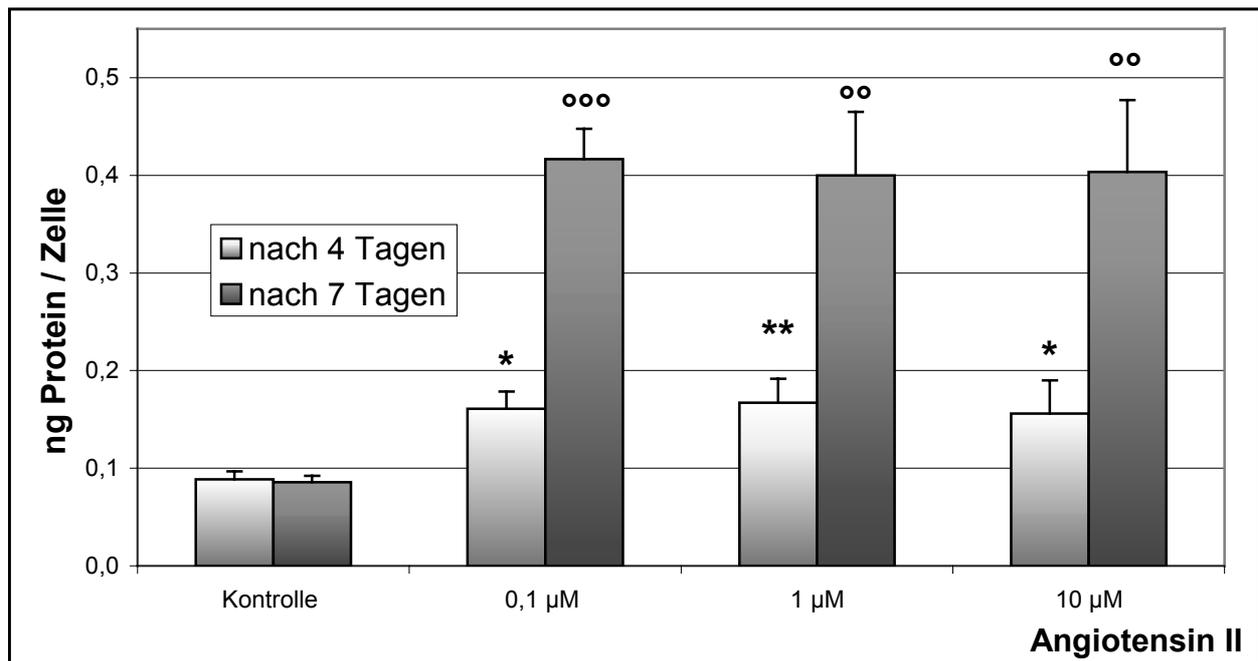


Abbildung 4-16: Hypertrophische Wirkung von Ang II auf die Mesangiumzellen. Die Zellen (24 h wachstumsarretiert) wurden mit 0,1 µM, 1 µM oder 10 µM Ang II inkubiert. Nach 4 und 7 Tagen wurde der Proteingehalt pro Zelle ermittelt ($n=3$, \pm SD). * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$ vs. Kontrolle 4 Tage; ° $P \leq 0,01$; °° $P \leq 0,001$ vs. Kontrolle 7 Tage.

Nach vier Tagen bewirkten alle untersuchten Ang II-Konzentrationen eine signifikante Proteingehaltzunahme pro Zelle im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, während die Zellzahl abnahm. Der Proteingehalt der Zellen nahm nach 7 Tagen noch weiter zu.

Dabei wurden keine Differenzen zwischen Proben, die nur mit Ang II oder mit Ang II plus 0,1% Ethanol (Vehikel von Valsartan) oder Ang II plus 0,0001 N NaOH (Vehikel von Ramiprilat) behandelt wurden (Ergebnisse sind nicht aufgezeigt), beobachtet.

4.3.4.2 Einfluss eines ACE-Hemmers und eines AT1-Rezeptorantagonisten auf die hypertrophische Wirkung von Ang II

Der ACE-Hemmer Ramiprilat zeigte im untersuchten Konzentrationsbereich keinen signifikanten Effekt auf die durch Ang II verursachte Zellhypertrophie (die Ergebnisse sind nicht aufgezeigt). Demgegenüber reduzierte der AT1-Rezeptorblocker Valsartan die durch Ang II hervorgerufene Hypertrophie der Mesangiumzellen signifikant (Abbildung 4-17).

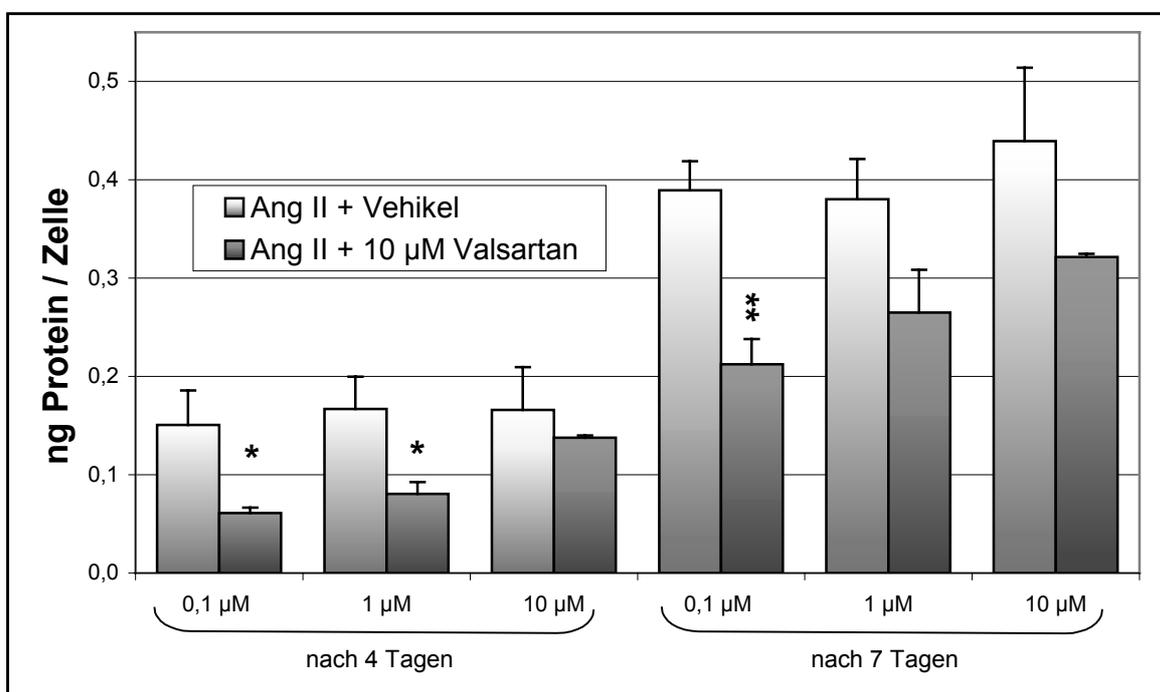


Abbildung 4-17: Einfluss von Valsartan auf die durch Ang II verursachte Hypertrophie der Mesangiumzellen. Wachstumsarretierte Zellen wurden 1 h mit 10 µM Valsartan vorbehandelt, bevor die Stimulation mit 0,1 µM und 1 µM Ang II stattfand. Nach 4 und 7 Tagen wurde der Proteingehalt pro Zelle ermittelt ($n = 3, \pm SD$). * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$ vs. Ang II mit Vehikel.

Vier Tage nach Stimulation wurde eine signifikante Hemmung der durch Ang II hervorgerufene Zellhypertrophie bei mit Valsartan behandelten Zellen beobachtet.

Nach 7 Tagen zeigte Valsartan eine signifikante Hypertrophiehemmung nur bei mit 0,1 µM Ang II stimulierten Zellen.

4.3.5 Einfluss von Valsartan auf die Egr-1 Genexpression

Es wurde eine Reduzierung der mit Ang II induzierten Genexpression von Egr-1 durch Valsartan (Abb. 4-18) beobachtet.

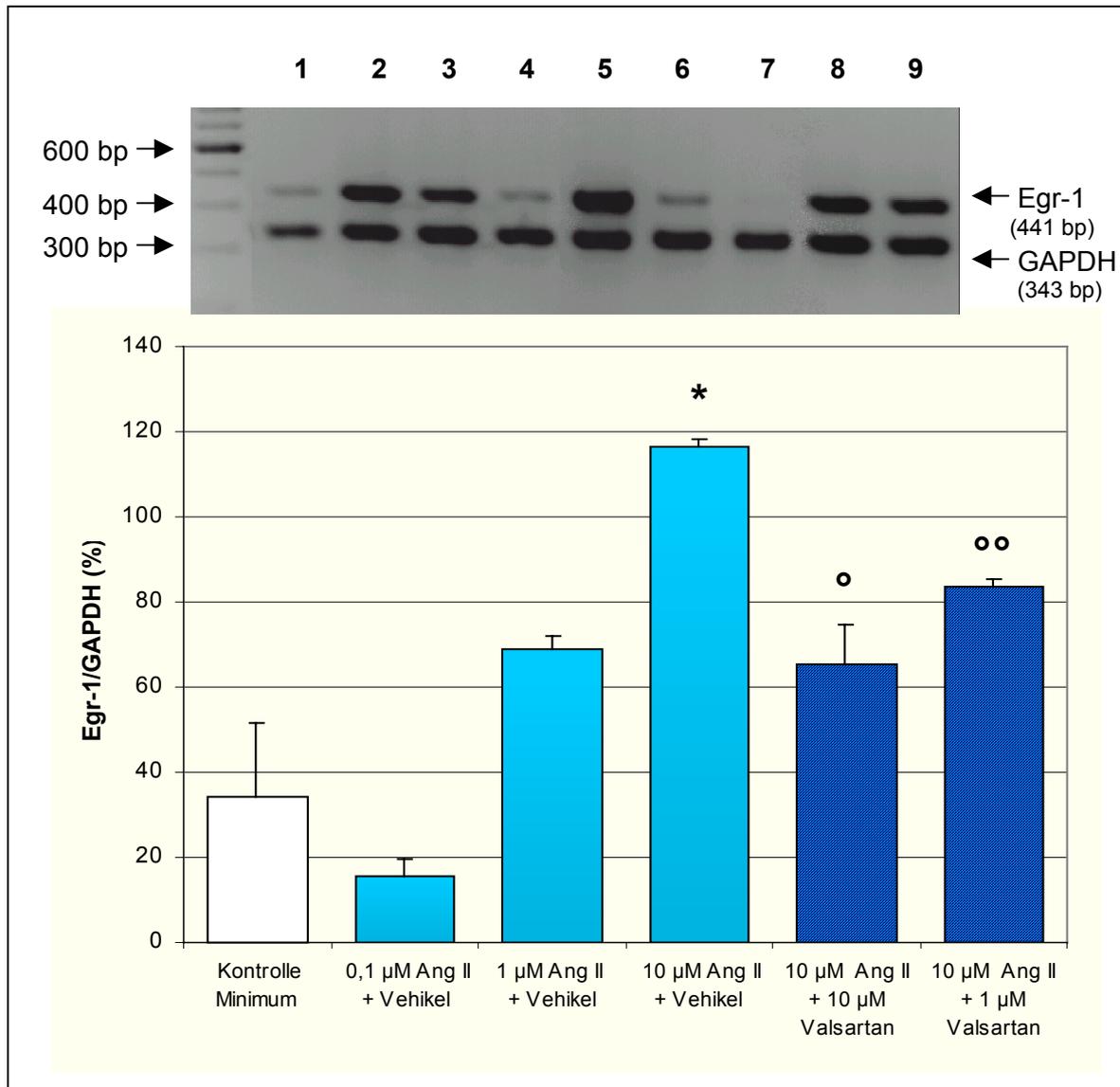


Abbildung 4-18: Genexpression von Egr-1 nach der Stimulation mit Ang II und Behandlung mit Valsartan. Wachstumsarretierte Mesangiumzellen waren 1 h mit Valsartan vorbehandelt worden, bevor die Zellen mit Ang II stimuliert wurden. Nach 90 min Inkubation wurde RNA isoliert und in RT-PCR eingesetzt. Oben: Repräsentatives RT-PCR-Gel. Lane 1: Kontrolle mit Vehikel; Lane 2, 3, 4: 10 µM, 1 µM, 0,1 µM Ang II; Lane 5, 6, 7: 10 µM, 1 µM, 0,1 µM Ang II plus Vehikel; Lane 8, 9: 10 µM Ang II plus 10 µM und 1 µM Valsartan. Unten: Densitometrische Auswertung der RT-PCR-Produkte. Die Grafik zeigt Mittelwerte \pm SD aus zwei Zellpräparationen, wobei von jedem Einzelexperiment 3 RT-PCR durchgeführt wurden. * $P \leq 0,05$ vs. Kontrolle; ° $P \leq 0,05$; °° $P \leq 0,01$ vs. Ang II.

Angiotensin II induzierte konzentrationsabhängig die Egr-1-Genexpression. Eine signifikante Expressionszunahme von Egr-1 im Vergleich zu unstimulierten Kontrolle zeigte sich bei Stimulation mit 10 μ M Ang II.

Die mit Ang II stimulierte Genexpression von Egr-1 konnte durch beide Konzentrationen von Valsartan (10 und 1 μ M) signifikant gehemmt werden.

4.4 Untersuchung der Proliferation von Mesangiumzellen unter dem Einfluss von Cerivastatin

4.4.1 Zytotoxische Wirkung von Cerivastatin auf die Mesangiumzellen (LDH-Test)

Welche Zytotoxizität Cerivastatin auf die Mesangiumzellen ausübt, wurde mit Hilfe des LDH-Tests untersucht.. Hierbei wurde zuerst die Prüfung der Zytotoxizität von Cerivastatin im serumreduzierten Medium (1% FCS) ohne Stimulus und dann im Medium unter Zytokinstimulation (0,5 nM IL-1 β) durchgeführt (Abbildung 4-19).

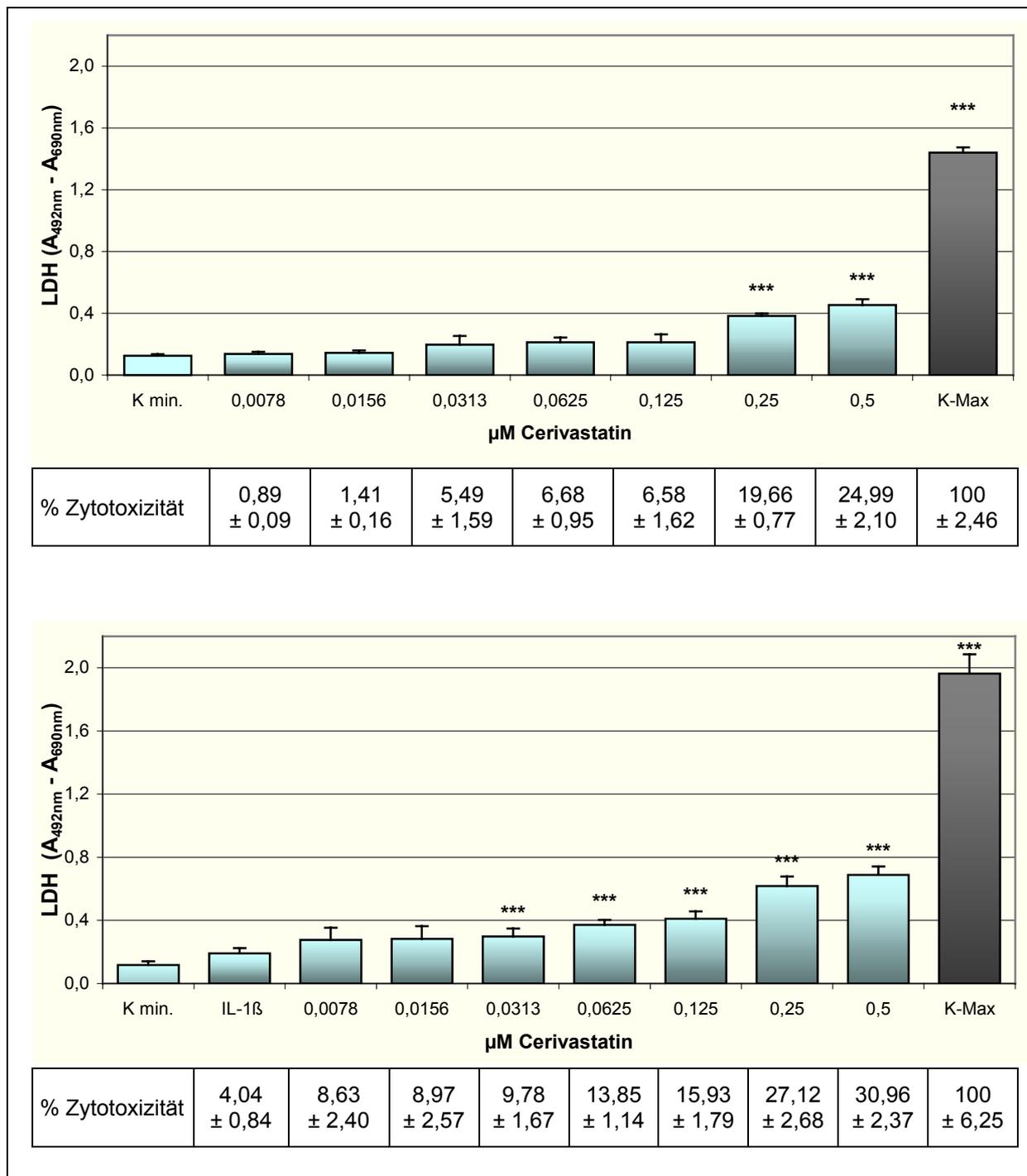


Abbildung 4-19: LDH-Test bei Mesangiumzellen nach Behandlung mit Cerivastatin. Wachstumsarretierte Mesangiumzellen wurden der Wirkung von Cerivastatin im serumreduziertem (1% FCS) Medium (oben) ohne oder mit 0,5 nM IL-1β (unten) ausgesetzt. Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen dem LDH-Test unterzogen. Als Kontrolle Maximum (100% Zytotoxizität) dienen Zellen, die mit 1% Triton-X-100 inkubiert wurden. Kontrolle Minimum stellen Zellen, die nur mit Medium inkubiert wurden, dar, (n=6, ± SD). * P ≤ 0,05; *** P ≤ 0,001 vs.Kontrolle Minimum.

Die Zytotoxizität von Cerivastatin betrug bis zu einer Konzentration 0,125 μM weniger als 10%. Die toxische Wirkung von Cerivastatin wurde deutlich höher, wenn die Zellen im Medium mit 0,5 nM IL-1 β inkubiert wurden. 0,5 μM Cerivastatin erzeugte eine Zytotoxizität von $24,99 \pm 2,10\%$ im Medium ohne IL-1 β und eine Zytotoxizität von $30,96 \pm 2,37\%$ im Medium mit IL-1 β . Das Zytokin IL-1 β (0,5 nM) führte alleine schon zu einer leicht erhöhten Freisetzung von LDH, was einer Zytotoxizität von $4,00 \pm 0,84\%$ entspricht.

4.4.2 Antiproliferative Wirkung von Cerivastatin

Im untersuchten Konzentrationsbereich (0,005 - 5 μM) zeigte Cerivastatin einen hemmenden Effekt sowohl auf die DNA-Synthese (BrdU-Assay) als auch auf das Wachstum (MTT-Tests) der Mesangiumzellen unabhängig davon, mit welchem Stimulus die Zellproliferation induziert wurde (Abb. 4-20 und 4-21).

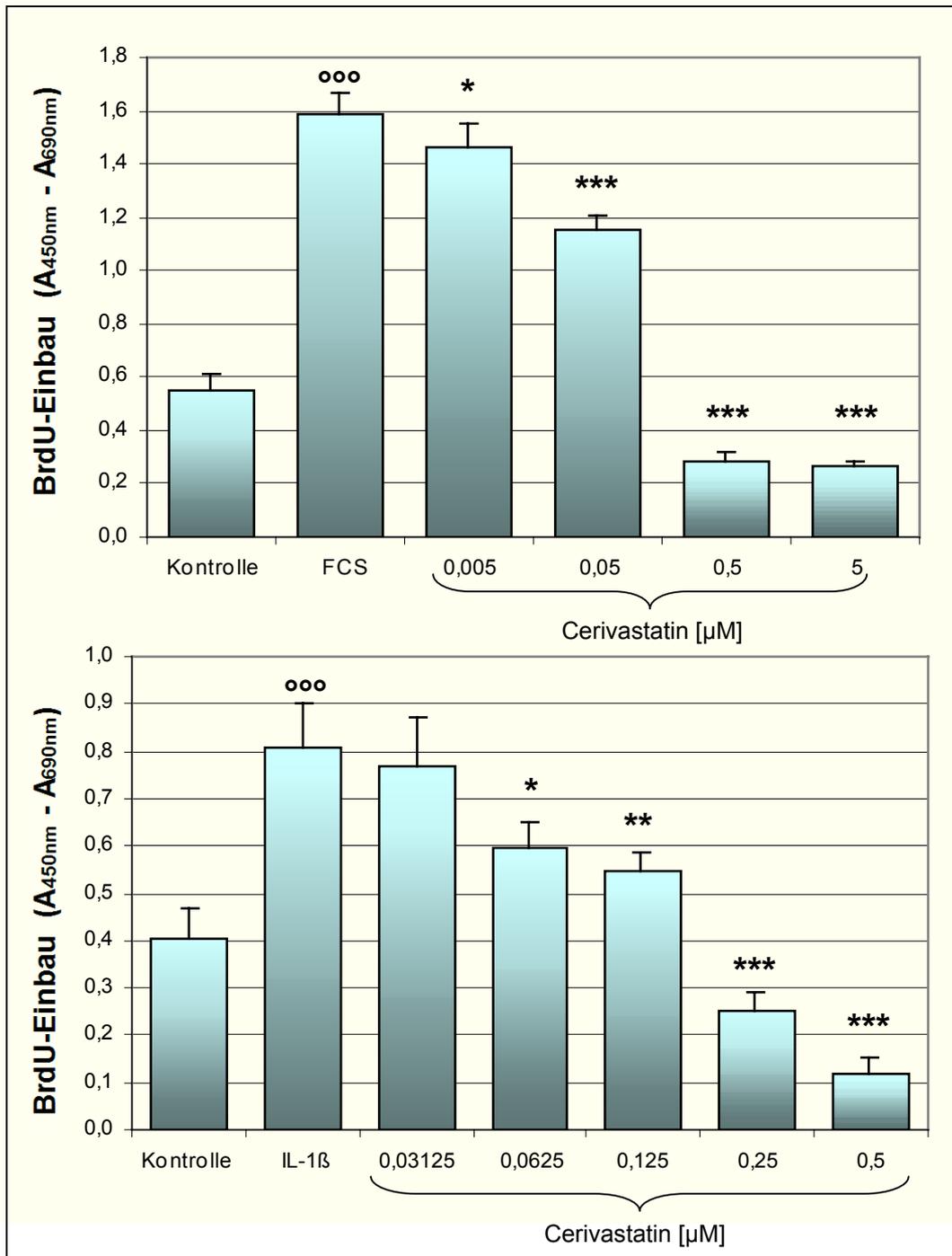
Wirkung von Cerivastatin auf DNA-Synthese

Abbildung 4-20: Einfluss von Cerivastatin auf die DNA-Synthese von mit FCS (oben) oder mit IL-1 β (unten) stimulierten Mesangiumzellen. Subkonfluente Zellen wurden zum Zeitpunkt 0 mit 10% FCS (oben) oder 0,5 nM IL1- β (unten) im serumreduzierten Medium (1% FCS) stimuliert und gleichzeitig mit verschiedenen Konzentrationen von Cerivastatin über 48 h behandelt. Gemessen wurde BrdU-Einbau in die DNA der Zellen nach 18 h ($n=6$, \pm SD), ° $P \leq 0,05$; °° $P \leq 0,01$; °°° $P \leq 0,001$ vs. 1% FCS Kontrolle; * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$ vs. Stimulus.

Der BrdU-Einbau von mit FCS stimulierten Zellen wurde schon durch die Wirkung von 0,005 μM Cerivastatin signifikant ($p \leq 0,05$) gehemmt, bei einer Konzentration von 0,5 μM erreichte Cerivastatin eine maximale Hemmung ($p \leq 0,001$). Bei Versuchen mit IL-1 β als Stimulus wurde Cerivastatin im Konzentrationsbereich 0,03125 - 0,5 μM untersucht, und auch in diesem Fall zeigte das Statin reduzierende Wirkung auf die DNA-Synthese der Mesangiumzellen, der BrdU-Einbau wurde ab 0,0625 μM Cerivastatin konzentrationsabhängig signifikant ($p \leq 0,05$) inhibiert.

Wirkung von Cerivastatin auf Proliferation der Mesangiumzellen gemessen mittels MTT-Test

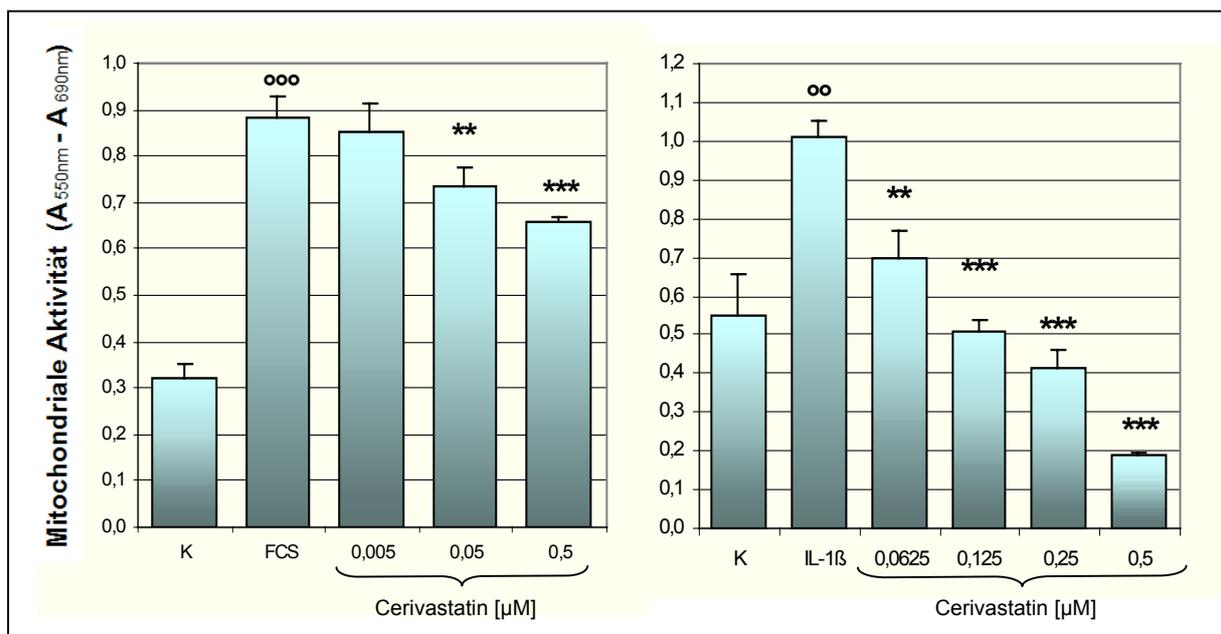


Abbildung 4-21: MTT-Test bei mit FCS (links) oder IL-1 β (rechts) stimulierten Mesangiumzellen mit oder ohne Cerivastatin-Behandlung. Subkonfluente Zellen wurden zum Zeitpunkt 0 mit 10% FCS oder 0,5 nM IL-1 β im serumreduzierten Medium (1% FCS) stimuliert und mit oder ohne Medikament inkubiert. Nach 48 h wurde die mitochondriale Aktivität der Zellen als OD im ELISA gemessen ($n=6$, \pm SD), °° $P \leq 0,01$; °°° $P \leq 0,001$ vs. 1% FCS Kontrolle; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$ vs. Stimulus.

Die oben dargestellten Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Zahl der proliferierenden Mesangiumzellen unter dem Einfluss von Cerivastatin niedriger wurde. Das Statin zeigte ab 0,05 μM bei mit 10% FCS und ab 0,0625 μM bei mit IL-1 β stimulierten Zellen eine signifikante Proliferaionshemmung. Somit stimmen die Ergebnisse von MTT-Test mit den Ergebnissen von BrdU-Assay überein.

4.4.3 Proliferation von Mesangiumzellen nach Behandlung mit Cerivastatin und einem iNOS-Hemmer

Weiterhin wurde untersucht, ob Cerivastatin auf die Proliferation der Mesangiumzellen möglicherweise über den Mediator Stickstoffmonoxid (NO) wirkt. Dazu wurden die Zellen zum Zeitpunkt 0 mit IL-1 β stimuliert und zusätzlich mit den NOS-Inhibitoren L-NMMA oder L-NIL inkubiert. Die Wirkung von L-NMMA wurde durch Inkubation mit L-Arginin, das als Substrat für die NO-Synthase dient, antagonisiert. Demgegenüber kann D-Arginin diesen Effekt von L-NMMA nicht umkehren. Für diese Versuche wurden zwei nicht-toxische Konzentrationen von Cerivastatin (0,05 und 0,1 μ M) gewählt, die nach BrdU- und MTT-Test proliferationshemmend wirkten.

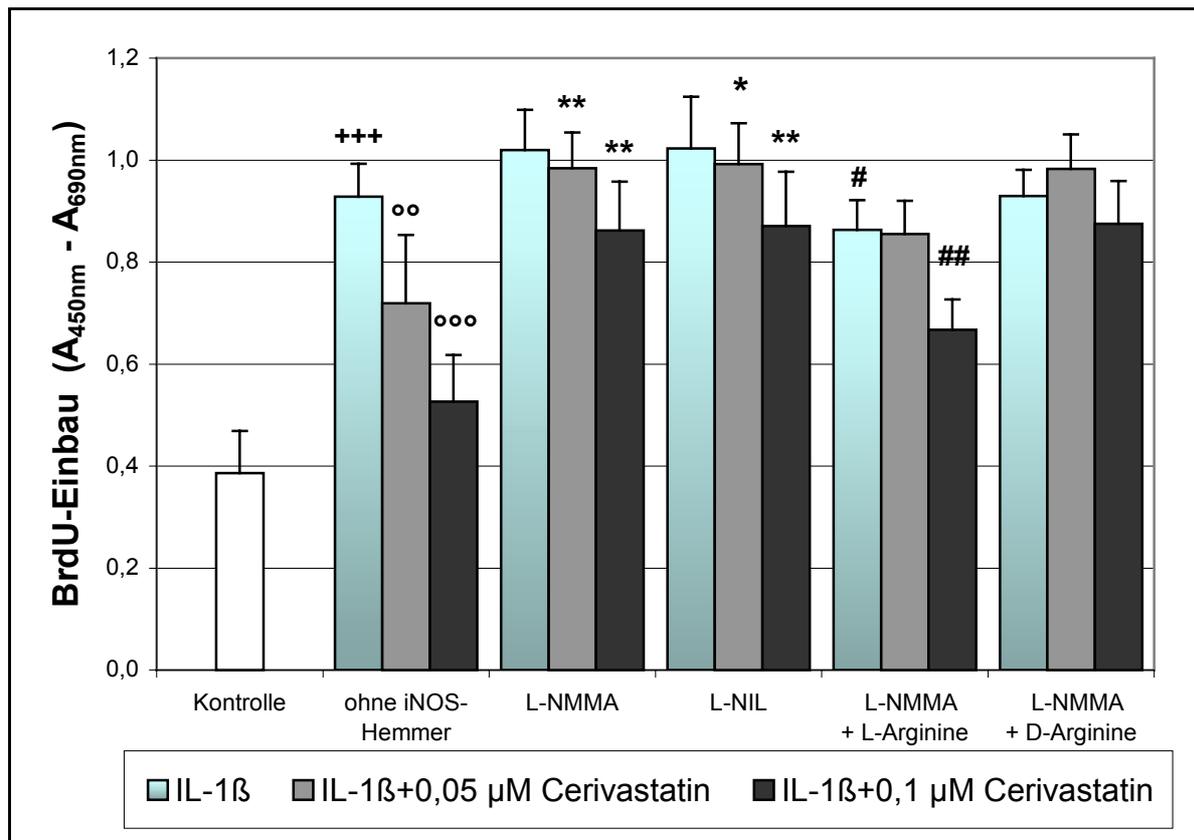


Abbildung 4-22: DNA-Synthese von mit IL-1 β stimulierten Mesangiumzellen ohne oder mit Cerivastatin-Behandlung mit oder ohne NOS Hemmer. Subkonfluente Zellen wurden mit 0,5 nM IL1- β im serumreduzierten Medium (1% FCS) stimuliert und gleichzeitig mit Cerivastatin (0,05 μ M und 0,1 μ M) ohne oder mit NOS-Hemmer (0,5 mM L-NMMA oder 0,5 mM L-NIL) ohne oder mit 2,5 mM L-Arginin oder 2,5 mM D-Arginin über 48 h behandelt. Gemessen wurde BrdU-Einbau in die DNA der Zellen nach 18 h ($n=6$, \pm SD), ⁺⁺⁺ $P \leq 0,001$ vs. Kontrolle, ^{°°} $P \leq 0,01$; ^{°°°} $P \leq 0,001$ vs. IL-1 β , ^{*} $P \leq 0,05$; ^{**} $P \leq 0,01$ vs. IL-1 β + Cerivastatin (ohne iNOS-Hemmer), [#] $P \leq 0,05$; ^{##} $P \leq 0,01$ vs. Proben mit L-NMMA.

Durch eine Koinkubation der Zellen mit einem der NOS-Inhibitoren (sowohl 0,5 mM L-NMMA als auch 0,5 mM L-NIL) ließ sich die antiproliferative Wirkung von Cerivastatin (0,05 μ M und 0,1 μ M) signifikant aufheben (Abb. 4-22 und 4-23). Die Zugabe von 2,5 mM L-Arginin führte zur Antagonisierung der Wirkung von LNMMA, während das inaktive Substrat D-Arginin keine Änderung der L-NMMA-Effekte erzielen konnte.

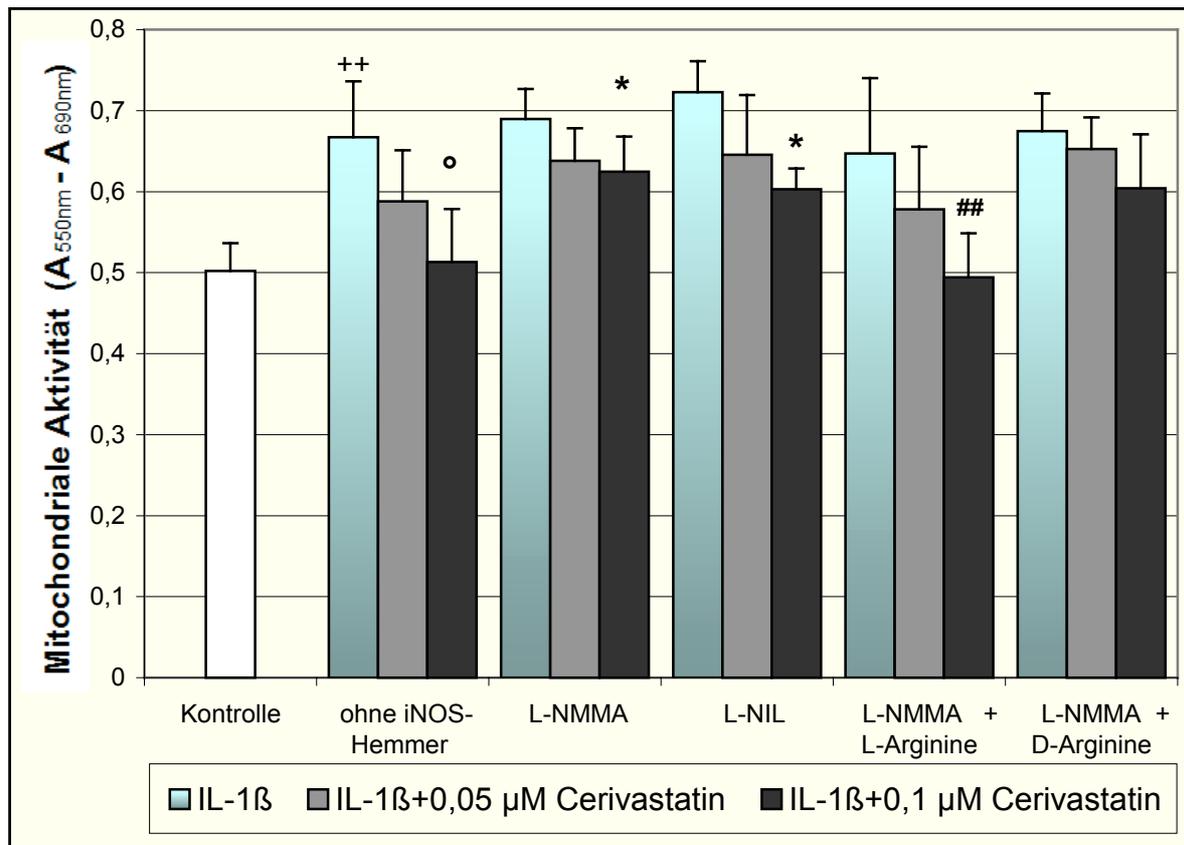


Abbildung 4-23: MTT-Test bei mit IL-1 β stimulierten Mesangiumzellen mit oder ohne Cerivastatin-Behandlung ohne oder mit NOS-Hemmer. Subkonfluente Zellen wurden zum Zeitpunkt 0 mit 0,5 nM IL-1 β im serumreduzierten Medium (1% FCS) stimuliert und mit oder ohne Cerivastatin (0,05 μ M und 0,1 μ M) mit oder ohne NOS-Hemmer (0,5 mM L-NMMA oder 0,5 mM L-NIL) ohne oder mit 2,5 mM L-Arginin oder D-Arginin behandelt. Nach 48 h wurde die mitochondriale Aktivität der Zellen als OD im ELISA gemessen (n=6, \pm SD), ⁺⁺ $P \leq 0,01$ vs. Kontrolle, [°] $P \leq 0,05$ vs. IL-1 β , ^{*} $P \leq 0,05$ vs. IL-1 β + Cerivastatin (ohne iNOS-Hemmer), ^{##} $P \leq 0,01$ vs. Proben mit L-NMMA.

4.4.4 Untersuchung der iNOS nach Behandlung mit Cerivastatin

4.4.4.1 Quantifizierung der NO-Produktion

Zunächst wurde NO-Produktion der Mesangiumzellen unter dem Einfluss von Cerivastatin nach Stimulation mit IL-1 β untersucht. Die Messwerte der zellulären NO-Freisetzung sind in Abbildung 4-24 dargestellt.

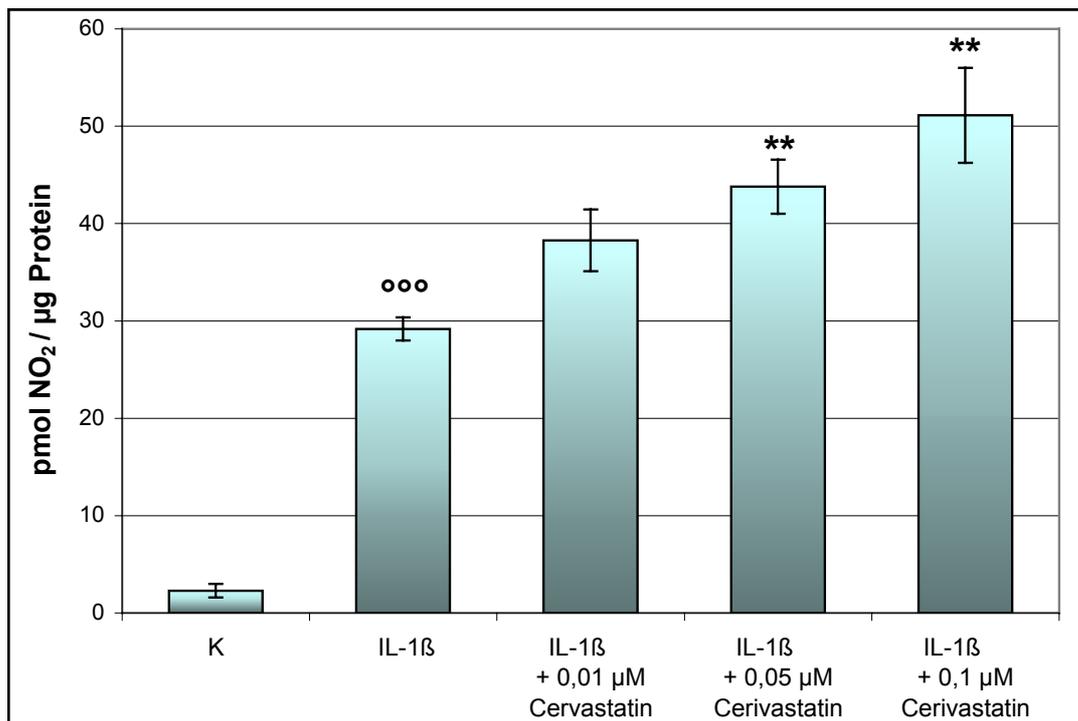


Abbildung 4-24: Einfluss von Cerivastatin auf die NO-Produktion der mit IL-1 β stimulierten Mesangiumzellen. Wachstumsarretierte Mesangiumzellen (24 h mit 0,25% FCS) waren zum Zeitpunkt 0 mit verschiedenen Konzentrationen von Cerivastatin vorbehandelt worden, bevor die Stimulation mit 0,5 nM IL-1 β stattfand. Nach 24 h wurde mittels Griess-Reagenz Gesamtnitritgehalt in zellulären Überständen gemessen. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den Ansätzen zu gewährleisten, wurde der mittels Griess-Reagenz quantifizierte Gesamtnitritgehalt auf jeweils 1 μ g Gesamtprotein der lysierten Zellen bezogen. Dargestellt sind Mittelwerte von 3 NO-Messungen aus jeweils 3 Versuchsansätzen \pm SD. °°° $P \leq 0,001$ vs. Kontrolle, ** $P \leq 0,01$ vs. IL-1 β .

Die Stimulation der Mesangiumzellen mit dem Zytokin IL-1 β führte zu einer signifikanten ($p \leq 0,001$) NO-Synthesesteigerung. Die durch IL-1 β induzierte NO-Produktion wurde durch Cerivastatin ab 0,05 μ M signifikant ($p \leq 0,01$) und konzentrationsabhängig gegenüber den mit Zytokin stimulierten Zellen erhöht. Die Inkubation der Zellen mit Cerivastatin alleine (ohne Zytokin) zeigte keine messbaren

Effekte (die Ergebnisse werden nicht aufgezeigt), das heißt, es konnte nicht nachgewiesen werden, ob Cerivastatin alleine die NO-Freisetzung induziert.

Hemmende Wirkung von L-NMMA

Die Reduktion der NO-Freisetzung unter einer Koinkubation mit L-NMMA (0,5 - 1 mM) zeigte, dass es sich um einen iNOS-abhängigen Effekt handelt. Die Abbildung 4-25 zeigt exemplarisch Ergebnisse der NO-Messung von Zellen, die mit IL-1 β ohne und mit Cerivastatin ohne oder mit L-NMMA und ohne oder mit L-Arginin oder D-Arginin inkubiert wurden.

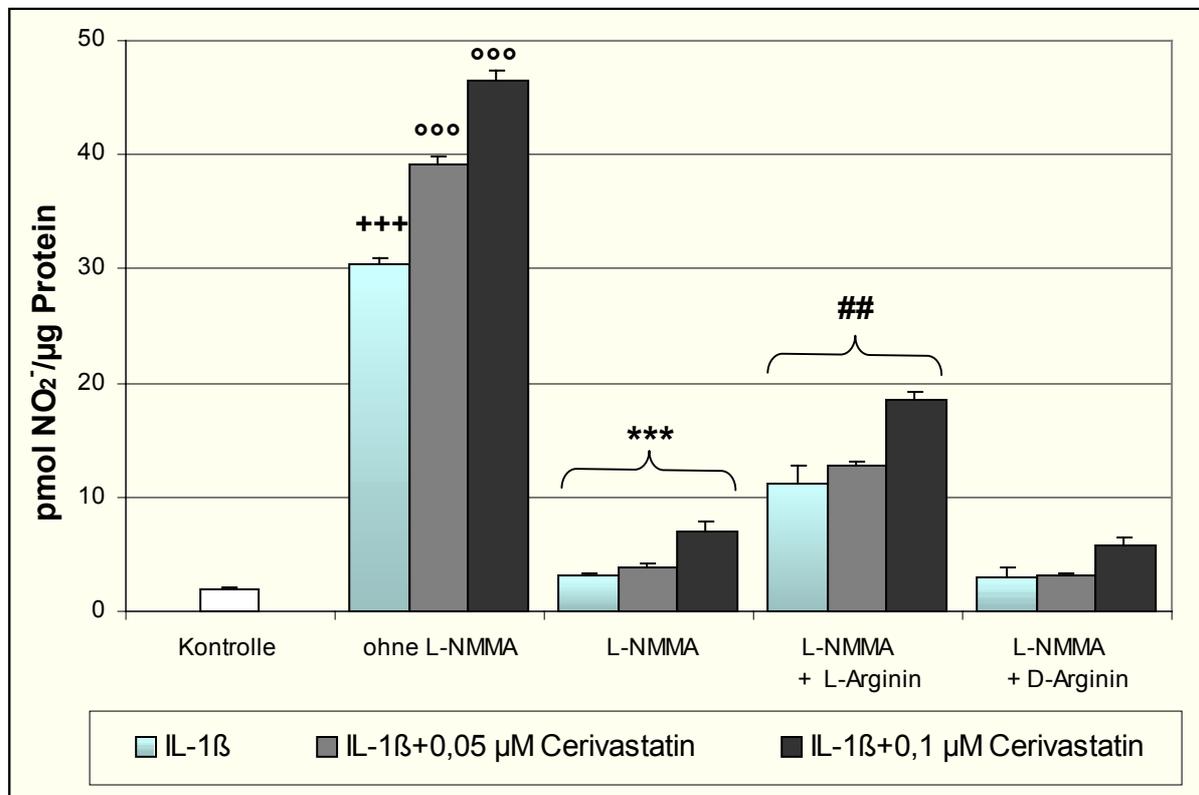
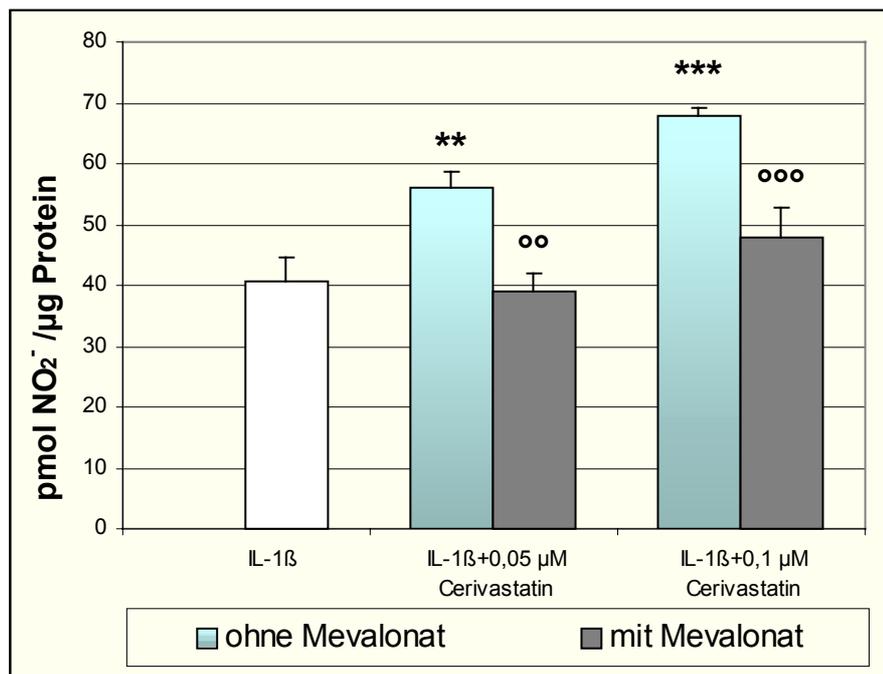


Abbildung 4-25: NO-Produktion der mit IL-1 β stimulierten Mesangiumzellen nach Behandlung mit Cerivastatin ohne oder mit L-NMMA. Wachstumsarretierte Mesangiumzellen waren zum Zeitpunkt 0 mit Cerivastatin (0,05 μ M und 0,1 μ M) ohne oder mit L-NMMA (1 mM) ohne oder mit L-Arginin oder D-Arginin (10 mM) vorbehandelt worden, bevor die Stimulation mit IL-1 β (0,5 nM) stattfand. Nach 24 h wurde der Gesamtnitritgehalt mittels Griess-Reagenz in zellulären Überständen gemessen. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den Ansätzen zu gewährleisten, wurde der mittels Griess-Reagenz quantifizierte Gesamtnitritgehalt auf jeweils 1 μ g Gesamtprotein der lysierten Zellen bezogen. Dargestellt sind Mittelwerte von 3 NO-Messungen aus jeweils 3 Versuchsansätzen \pm SD ⁺⁺⁺ $P \leq 0,001$ vs. Kontrolle, ^{°°°} $P \leq 0,001$ vs. IL-1 β (ohne L-NMMA), ^{***} $P \leq 0,001$ vs. IL-1 β und vs. IL-1 β +Cerivastatin (ohne L-NMMA), ^{##} $P \leq 0,01$ vs. Proben mit L-NMMA.

Der NOS-Inhibitor L-NMMA (1 mM) führte zu einer signifikanten ($p \leq 0,001$) Reduktion der durch IL-1 β (0,5 nM) und durch IL-1 β plus Cerivastatin (0,05 und 0,1 μ M) vermittelten NO-Steigerung. Dieser Effekt wurde durch Zusatz von L-Arginin (10 mM) vermindert, indem die NO-Produktion wieder signifikant ($p \leq 0,01$) erhöht wurde. D-Arginin (10 mM) konnte den hemmenden Effekt von L-NMMA auf die NO-Bildung nicht beeinflussen, die gemessene NO-Konzentration im Vergleich zu Proben mit L-NMMA blieb unverändert.

Inkubation mit Mevalonat

Die unter Cerivastatin gesteigerte NO-Produktion konnte durch Gabe von Mevalonat, einem Zwischenprodukt der Cholesterinsynthese, signifikant ($p \leq 0,01$ bei 0,05 μ M



Cerivastatin und $p \leq 0,001$ bei 0,1 μ M Cerivastatin) aufgehoben werden (Abb. 4-26).

Abbildung 4-26: NO-Produktion der mit IL-1 β stimulierten Mesangiumzellen nach Behandlung mit Cerivastatin ohne oder mit Mevalonat. Wachstumsarretierte Mesangiumzellen waren zum Zeitpunkt 0 mit Cerivastatin (0,05 μ M und 0,1 μ M) ohne oder mit Mevalonat (100 μ M) vorbehandelt worden, bevor die Stimulation mit IL-1 β (0,5 nM) stattfand. Nach 24 h wurde der Gesamtnitritgehalt mittels Griess-Reagenz in zellulären Überständen gemessen. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den Ansätzen zu gewährleisten, wurde der mittels Griess-Reagenz quantifizierte Gesamtnitritgehalt auf jeweils 1 μ g Gesamtprotein der lysierten Zellen bezogen. Dargestellt sind Mittelwerte von 3 NO-Messungen aus jeweils 3 Versuchsansätzen \pm SD. ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$ vs. IL-1 β , °° $P \leq 0,01$; °°° $P \leq 0,001$ vs. IL-1 β und Cerivastatin (ohne Mevalonat).

4.4.4.2 Einfluss von Cerivastatin auf die Genexpression von iNOS bestimmt durch Northern Blot-Analyse

Wie anhand der Nitrit-Bestimmung im zellulären Überstand gezeigt wurde, kam es bei den Mesangiumzellen nach einer Zytokinstimulation zu einer nachweisbaren iNOS-Aktivität, die durch Cerivastatin verstärkt wurde. Mittels Northern-Blot Analyse konnte die iNOS-Expression auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Die Northern-Blot Analysen wurden nach einer 24-stündigen Inkubation mit 0,5 nM IL-1 β ohne oder mit Cerivastatin (0,005 μ M, 0,01 μ M, 0,05 μ M und 0,1 μ M) durchgeführt. Die Abbildung 4-27 zeigt repräsentativ die Ergebnisse von Northern-Blot-Analysen.

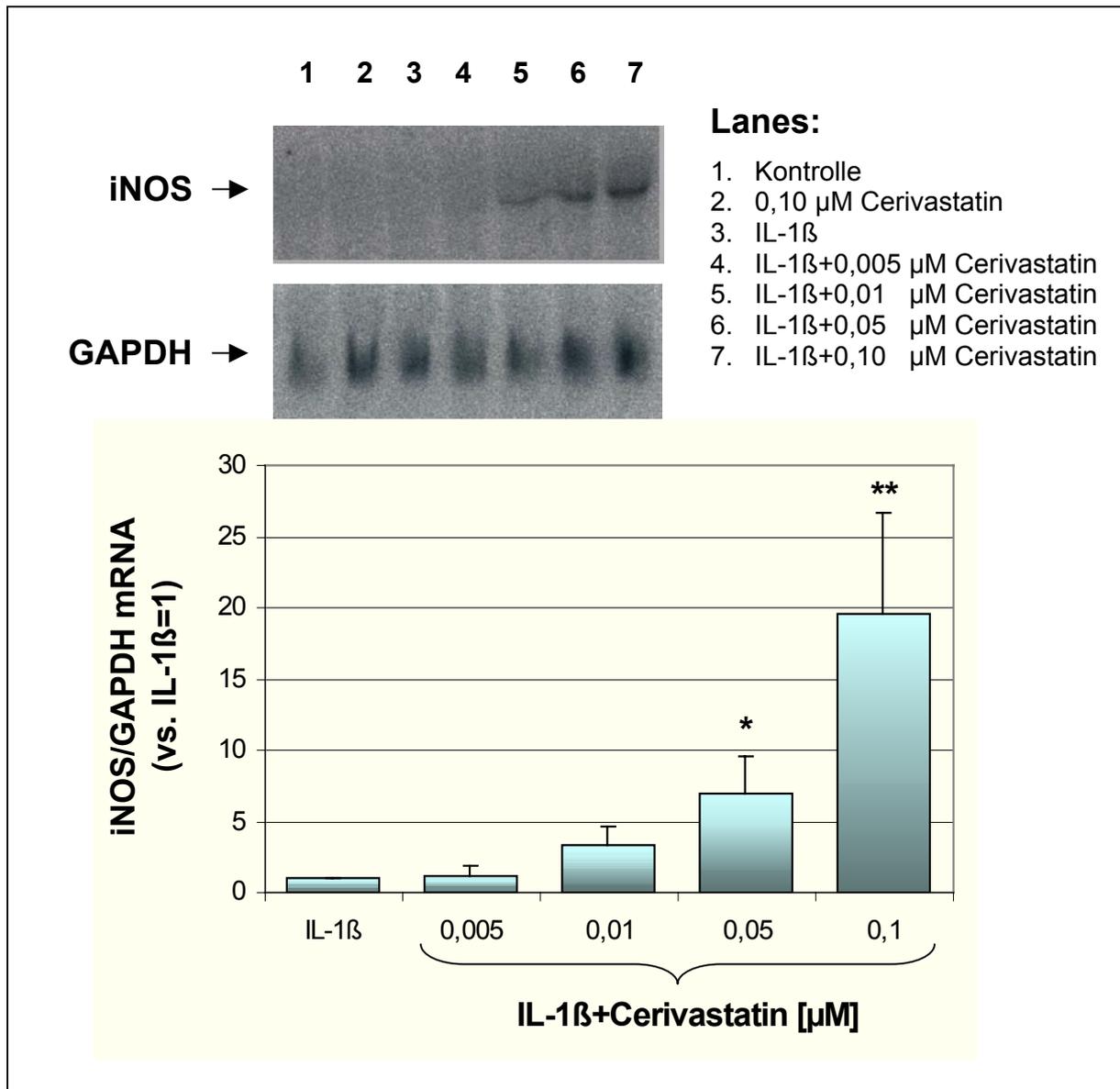


Abbildung 4-27: Einfluss von Cerivastatin auf die iNOS-mRNA in mit IL-1 β stimulierten Mesangiumzellen. Wachstumsarretierte Mesangiumzellen waren zum Zeitpunkt 0 mit verschiedenen Konzentrationen von Cerivastatin vorbehandelt worden, bevor die Stimulation mit IL-1 β (0,5 nM) stattfand. Nach 24 h Inkubation wurde Gesamt-RNA isoliert, elektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Detektion der iNOS-mRNA (4,3 kB) erfolgte mittels einer radioaktiv markierten Sonde und anschließend wurden die Signale autoradiographisch analysiert. Alle Northern-Blots wurden mit einer GAPDH spezifischen Sonde rehybridisiert. Oben: Repräsentativer Northern-Blot. Unten: Densitometrische Auswertung der Northern-Blots von drei Zellpräparationen, dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$ vs. IL-1 β .

In unstimulierten Zellen (Spur 1) konnte keine iNOS-mRNA nachgewiesen werden. Eine Inkubation der Mesangiumzellen nur mit Cerivastatin ohne Zytokinstimulation (Spur 2) führte auch zu keiner Induktion von iNOS. Erst durch Stimulation der Zellen mit IL-1 β (Spur 3) konnte eine detektierbare Induktion der NOS auf transkriptioneller Ebene erreicht werden. Die mit IL-1 β angeregte iNOS-mRNA Synthese wurde durch Cerivastatin noch stärker (Spur 4, 5), bereits unter 0,05 μ M Cerivastatin (Spur 6) wurden die Hybridisierungssignale sechsfach und unter dem 0,1 μ M Cerivastatin (Spur 7) 20-fach ($p \leq 0,01$) stärker als die Signale unter IL-1 β alleine.

4.4.4.3 Einfluss von Cerivastatin auf die Proteinexpression von iNOS

Ergänzend zu den Nitritbestimmungen und iNOS-mRNA Untersuchungen wurde der iNOS Nachweis auf Proteinebene im Western-Blot Verfahren durchgeführt. Hierzu wurden Zellen, von denen in Kulturüberständen NO-Bildung bestimmt wurde, verwendet. Die Expression des iNOS -Proteins wurde densitometrisch ausgewertet und mit einem Referenzprotein (Actin) verglichen. Die Ergebnisse von den Western-Blots wurden in Abbildung 4-28 dargestellt.

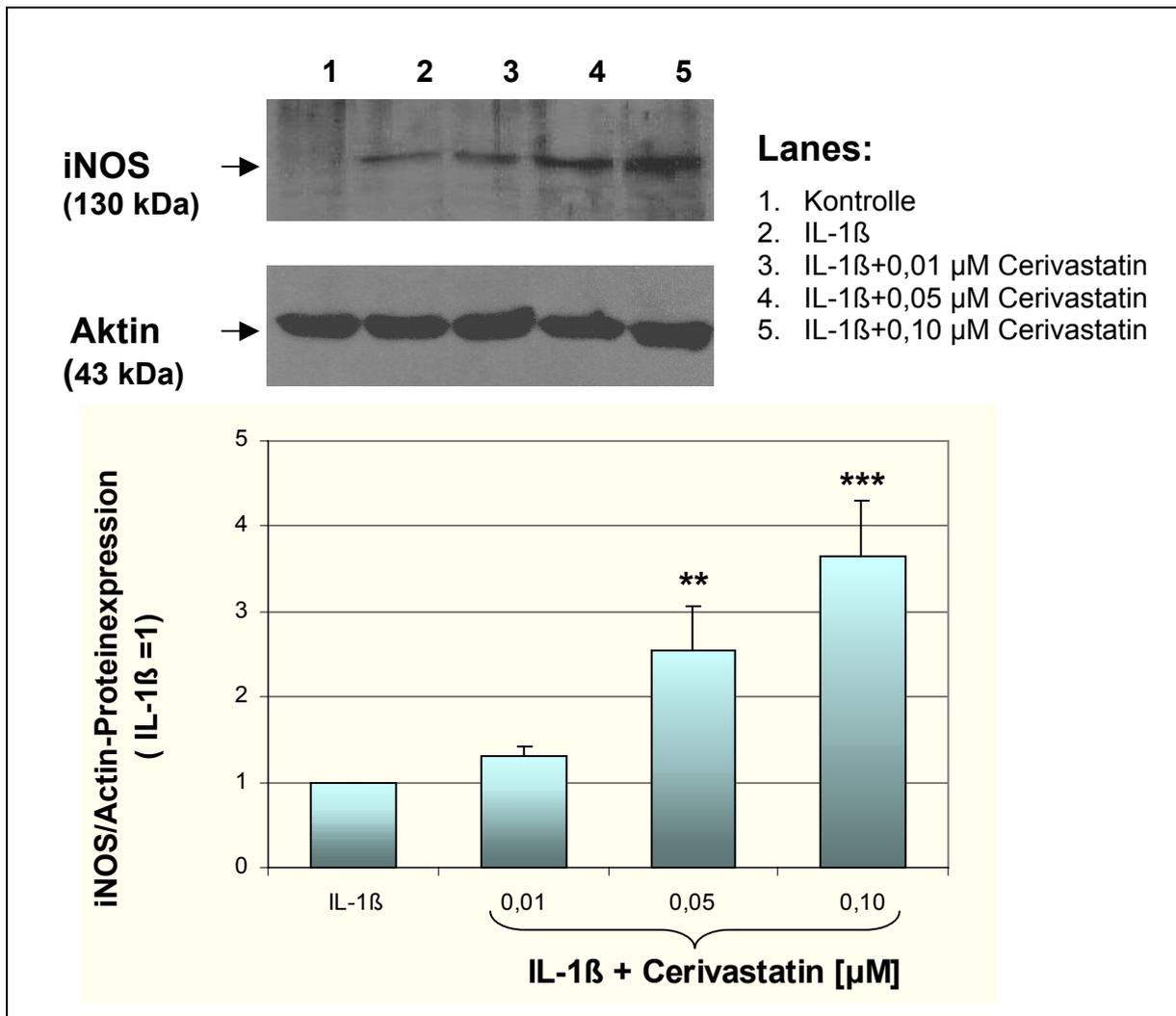


Abbildung 4-28: Einfluss von Cerivastatin auf iNOS-Proteinexpression in Mesangiumzellen. Lysate (je 15 μ g Protein/Lane) der Kontrolle (0,25% FCS) oder mit IL-1 β stimulierten ohne oder mit Cerivastatin (0,01; 0,05; 0,1 μ M) vorbehandelten Zellen wurden in einem 8%-igen SDS-Gel aufgetrennt und auf PVDF-Membran geblottet. Die Detektion erfolgte mit einem anti-iNOS-Antikörper und einer nachgeschalteten ECL-Reaktion. Die Proteinexpression von iNOS wurde densitometrisch ausgewertet und relativ zur Expression eines Referenzproteins (Actin) berechnet. Oben: Repräsentativer Western-Blot. Unten: Densitometrische Analyse. Die Signalstärken sind vs. IL-1 β (IL-1 β = 1) angegeben und stellen die Mittelwerte aus drei Experimenten \pm SD, dar. ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$ vs. IL-1 β

Eine Proteinexpression von iNOS in unstimulierten Mesangiumzellen konnte im Western-Blot-Verfahren nicht nachgewiesen werden (Spur 1). Mit Cerivastatin alleine vorbehandelte Zellen wiesen keine detektierbaren iNOS-Proteinmengen auf. Erst die Inkubation der Zellen mit 0,5 nM IL-1 β führt zur Stimulation der iNOS (Spur 2) und Cerivastatin konnte die durch IL-1 β angeregte iNOS-Protein Synthese ab einer Konzentration von 0,05 μ M signifikant ($p \leq 0,01$) verstärken (Spur 4 und 5).

Hemmende Wirkung von L-NMMA

Die Inkubation der Mesangiumzellen mit dem NOS-Inhibitor L-NMMA resultierte in einer signifikanten Reduktion der durch IL-1 β und IL-1 β mit Cerivastatin vermittelten iNOS-Proteinexpression (Abb. 4-29).

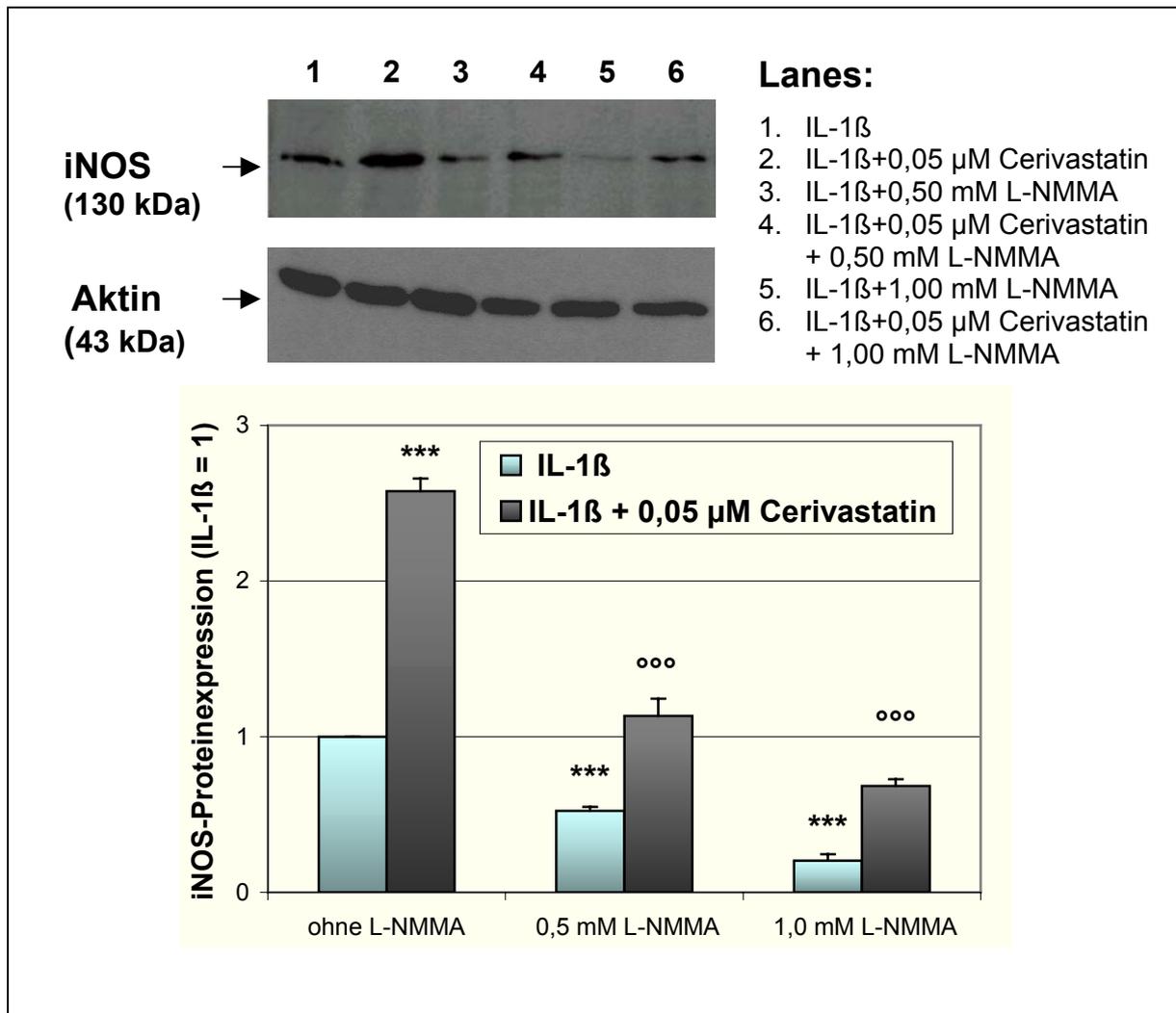


Abbildung 4-29: iNOS-Proteinexpression in mit Cerivastatin ohne oder mit L-NMMA behandelten Mesangiumzellen. Lysate (je 15 μ g Protein/Lane) wurden in einem 8%-igen SDS-Gel aufgetrennt und auf PVDF-Membran geblottet. Die Detektion erfolgte mit einem anti-iNOS-Antikörper und einer nachgeschalteten ECL-Reaktion. Die Proteinexpression von iNOS wurde densitometrisch ausgewertet und relativ zur Expression eines Referenzproteins (Aktin) berechnet. Oben: Repräsentativer Western-Blot. Unten: Densitometrische Analyse. Die Signalstärken sind vs. IL-1 β (=1) angegeben und stellen die Mittelwerte aus drei Experimenten \pm SD, dar. *** $P \leq 0,001$ vs. IL-1 β (ohne L-NMMA), ooo $P \leq 0,001$ vs. IL-1 β +Cerivastatin (ohne LNMMA).

Sowohl die durch 0,5 nM IL-1 β (Spur 1) induzierte als auch durch 0,05 μ M Cerivastatin (Spur 2) verstärkte iNOS-Protein Synthese konnte durch L-NMMA (0,5 mM, 1 mM) signifikant ($p \leq 0,001$) inhibiert werden (Spur 3, 4, 5, 6).

4.4.5 Proliferation von Mesangiumzellen nach Behandlung mit Cerivastatin und mit einem Cyclooxygenase-Hemmer

Um zu erklären, ob Cerivastatin die Proliferation der Mesangiumzellen möglicherweise über eine erhöhte Synthese von Prostaglandinen beeinflussen kann, wurden die Zellen entweder mit Celecoxib (selektiver COX-2 Hemmer) oder Indomethacin (unselektiver COX-Hemmer) inkubiert. Keine Änderungen des Proliferationsverhaltens der Mesangiumzellen wurden unter der Wirkung von bis 2,5 μ M Celecoxib und bis 10 μ M Indomethacin beobachtet. Auch die antiproliferative Wirkung von Cerivastatin war unter Zugabe von Indomethacin und Celecoxib bei erwähnten Konzentrationen unverändert (diese Ergebnisse werden nicht aufgezeigt). Die Behandlung der Zellen mit 5 und 10 μ M Celecoxib, oder mit 20 und 100 μ M Indomethacin führte zu einer Proliferationsinhibierung der Zellen (Abb. 4-30). Beide COX-Hemmer, sowohl Celecoxib (5 und 10 μ M) als auch Indomethacin (20 und 100 μ M) zeigten eine signifikante ($p \leq 0,001$) reduzierende Wirkung auf die durch IL-1 β stimulierte DNA-Synthese. Die BrdU-Einbaurrate wurde signifikant ($p \leq 0,001$) und noch stärker gehemmt, wenn die Zellen der Wirkung von Cerivastatin mit einem COX-Hemmer ausgesetzt worden waren.

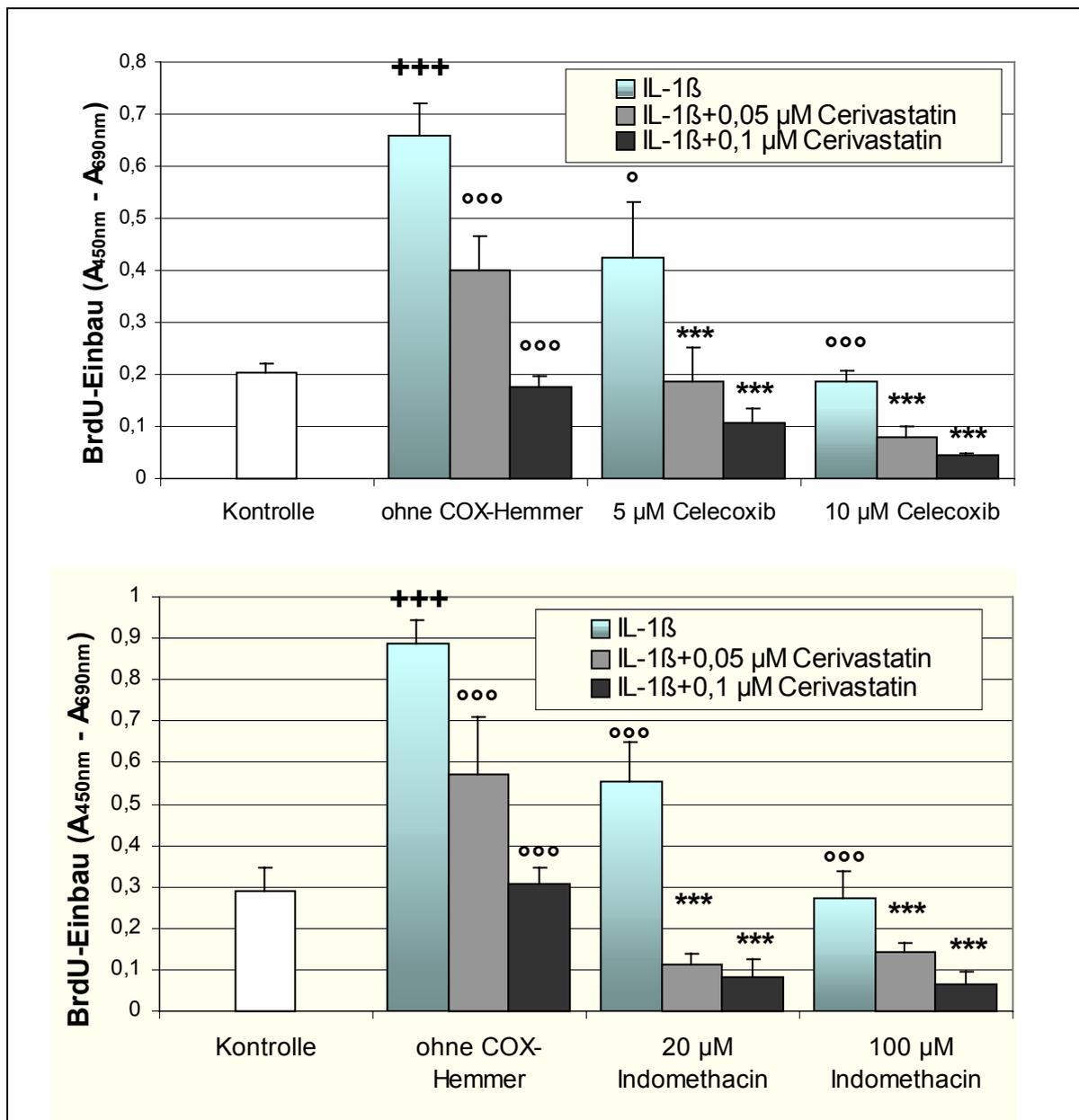


Abbildung 4-30: Proliferation von mit *IL-1β* stimulierten Mesangiumzellen ohne oder mit Cerivastatin-Behandlung ohne oder mit einem COX-Hemmer. Subkonfluente Zellen wurden mit *IL-1β* (0,5 nM) im serumreduzierten Medium (1% FCS) stimuliert und gleichzeitig mit Cerivastatin (0,05 μM und 0,1 μM) ohne oder mit Celecoxib (**oben**) oder Indomethacin (**unten**) über 48 h behandelt. Gemessen wurde BrdU-Einbau in die DNA der Zellen nach 18 h (n=6, ± SD), +++ $P \leq 0,001$ vs. Kontrolle, ° $P \leq 0,05$; °° $P \leq 0,001$ vs. *IL-1β* (ohne COX-Hemmer), *** $P \leq 0,001$ vs. *IL-1β* + Cerivastatin (ohne COX-Hemmer).

Die beobachteten Hemmeffekte von Celecoxib sind nicht auf die toxische Wirkung dieses Medikamentes zurückzuführen, da unter dem Einfluss von Celecoxib signifikant ($p \leq 0,05$) geringere Konzentrationen von freigesetzten LDH gemessen wurden. Unter 20 μM Indomethacin blieben die LDH-Werte unverändert. Eine Inkubation der Zellen mit 100 μM Indomethacin führte zu einer leichten, aber signifikanten ($p \leq 0,001$ vs. IL-1 β und $p \leq 0,01$ vs. IL-1 β mit Cerivastatin) Erhöhung der LDH-Freisetzung (Abb. 4-31).

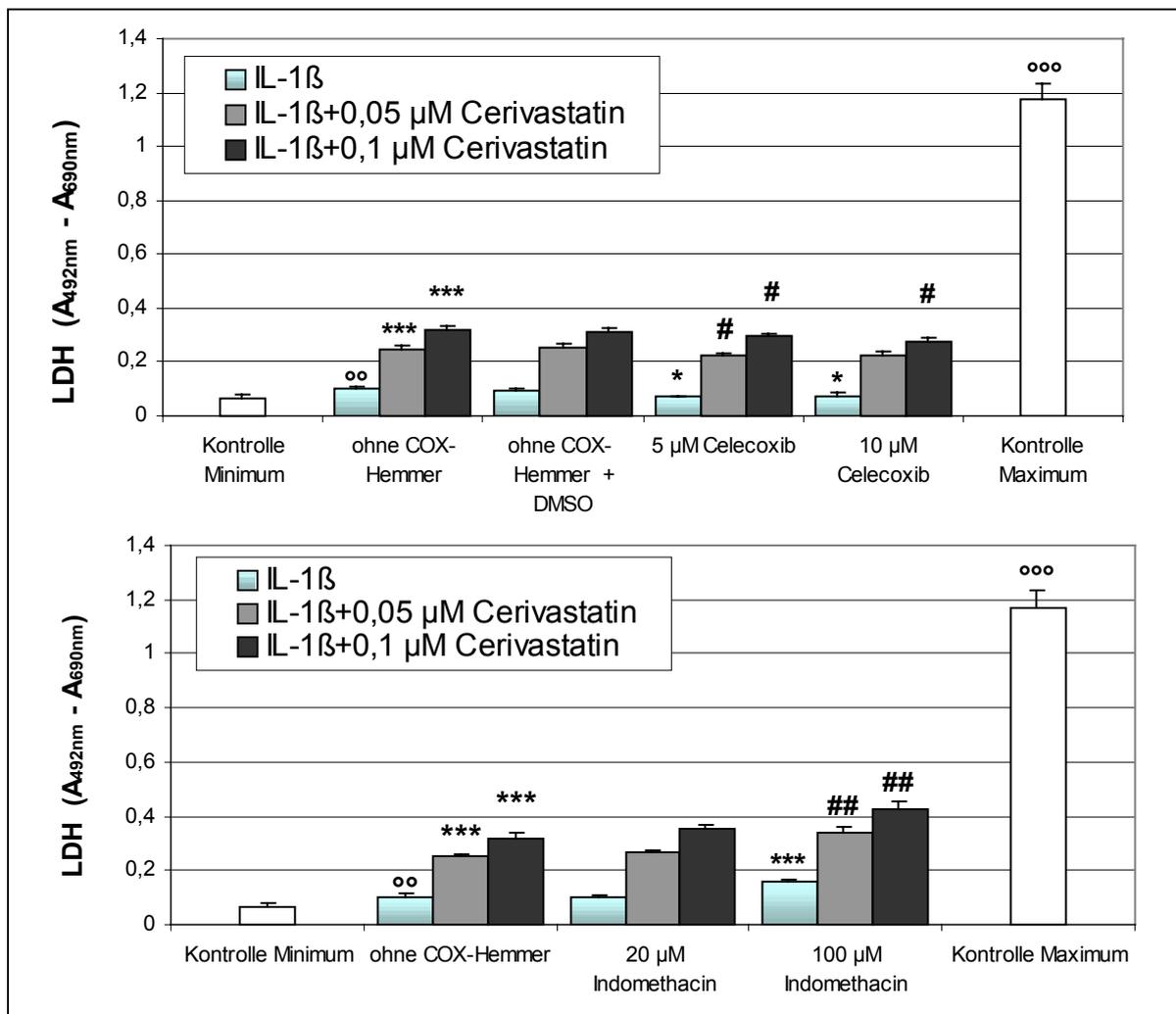


Abbildung 4-31: LDH-Test bei Mesangiumzellen, die mit IL-1 β stimuliert und mit Cerivastatin ohne oder mit einem COX-Hemmer behandelt wurden.

Wachstumsarretierte Mesangiumzellen wurden mit 0,5 nM IL-1 β in serumreduziertem Medium (1% FCS) stimuliert und der Wirkung von Cerivastatin alleine oder mit Celecoxib (**oben**) oder mit Indomethacin (**unten**) ausgesetzt. Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen dem LDH-Test unterzogen. Als Kontrolle Maximum dienen Zellen, die mit 1% Triton-X-100 inkubiert wurden. Kontrolle Minimum stellen Zellen, die nur mit Medium inkubiert wurden, dar, ($n=6$, \pm SD). ^{oo} $P \leq 0,01$ vs. Kontrolle Minimum, ^{*} $P \leq 0,05$; ^{***} $P \leq 0,001$ vs. IL-1 β (ohne COX-Hemmer); [#] $P \leq 0,05$; ^{##} $P \leq 0,01$ vs. IL-1 β + Cerivastatin (ohne COX-Hemmer).

4.4.6 Untersuchung der COX-2 abhängigen Prostaglandinsynthese sowie der COX-2-Expression nach Behandlung mit Cerivastatin

4.4.6.1 Einfluss von Cerivastatin auf die Prostaglandinbildung

Bei diesem Experiment wurde untersucht, ob Cerivastatin die durch die Cyclooxygenase 2 unter IL-1 β Wirkung verstärkte Prostaglandinbildung beeinflusst. Demnächst wurde überprüft, welchen Effekt eine Koinkubation von Cerivastatin mit Celecoxib, der selektiv die COX-2 Aktivität inhibiert, auf die Prostaglandinbildung bewirkt. In nach 24 h Inkubation gesammelten zellulären Überständen wurden die stabilen Index-Metabolite von Prostaglandinen E₂, I₂ und TxA₂ (bicyclo-PGE₂, 6-keto-PGF_{1 α} , TxB₂) durch Radio-Immuno-Assay bestimmt. Die Konzentration von bicyclo-PGE₂ und TxB₂ lagen im Grenzbereich. Demgegenüber konnten messbare Konzentrationen von 6-keto- PGF_{1 α} detektiert werden (Abb. 4-32).

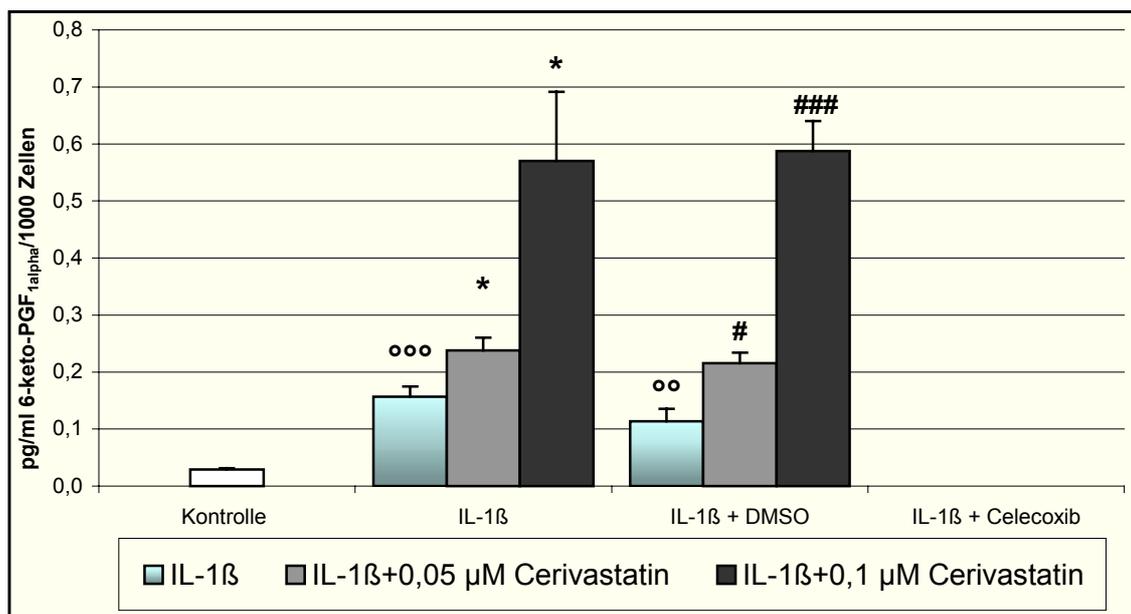


Abbildung 4-32: Einfluss von Cerivastatin auf Prostacyclinbildung in mit IL-1 β stimulierten Mesangiumzellen ohne oder mit Koinkubation mit Celecoxib. Wachstumsarretierte Mesangiumzellen waren zum Zeitpunkt 0 mit Cerivastatin (0,05 μ M und 0,1 μ M) ohne oder mit Celecoxib (5 μ M) vorbehandelt worden, bevor die Stimulation mit IL-1 β (0,5 nM) stattfand. Nach 24 h wurde Konzentration von 6-keto- PGF_{1 α} mittels Radio-Immuno-Assay in zellulären Überständen gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte von 3 Messungen aus jeweils 3 Versuchsansätzen \pm SD, °° $P \leq 0,01$; °°° $P \leq 0,001$ vs. Kontrolle; * $P \leq 0,05$ vs. IL-1 β , # $P \leq 0,05$; ### $P \leq 0,001$ vs. IL-1 β + DMSO.

Die Synthese von Prostacyclin PGI_2 wurde durch $\text{IL-1}\beta$ signifikant ($p \leq 0,001$) stimuliert. Unter dem Einfluss von Cerivastatin produzierten die Mesangiumzellen mehr PGI_2 , die gemessenen Konzentrationen von 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ waren unter $0,05 \mu\text{M}$ Cerivastatin signifikant ($p \leq 0,05$) und um den Faktor 2, und unter $0,1 \mu\text{M}$ Cerivastatin signifikant ($p \leq 0,001$) und um den Faktor 6 höher als unter $\text{IL-1}\beta$ alleine. Die Koinkubation mit Celecoxib führte zu einer vollständigen Hemmung der Prostacyclinproduktion, keine detektierbaren Mengen von 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ konnten festgestellt werden.

4.4.6.2 COX-2-Proteinexpression unter Wirkung von Cerivastatin

Weiter sollte die Wirkung von Cerivastatin auf die Proteinexpression von COX-2 geprüft werden. Infolge einer verstärkten COX-2 Aktivität ist im Rahmen der inflammatorischen Stimulation der MZ auch mit einer gesteigerten Prostaglandinbildung zu rechnen. Eine COX-2-Proteinexpression konnte unter Cerivastatin in unstimulierten Zellen im Western-Blot nicht nachgewiesen werden (diese Ergebnisse werden nicht aufgezeigt).

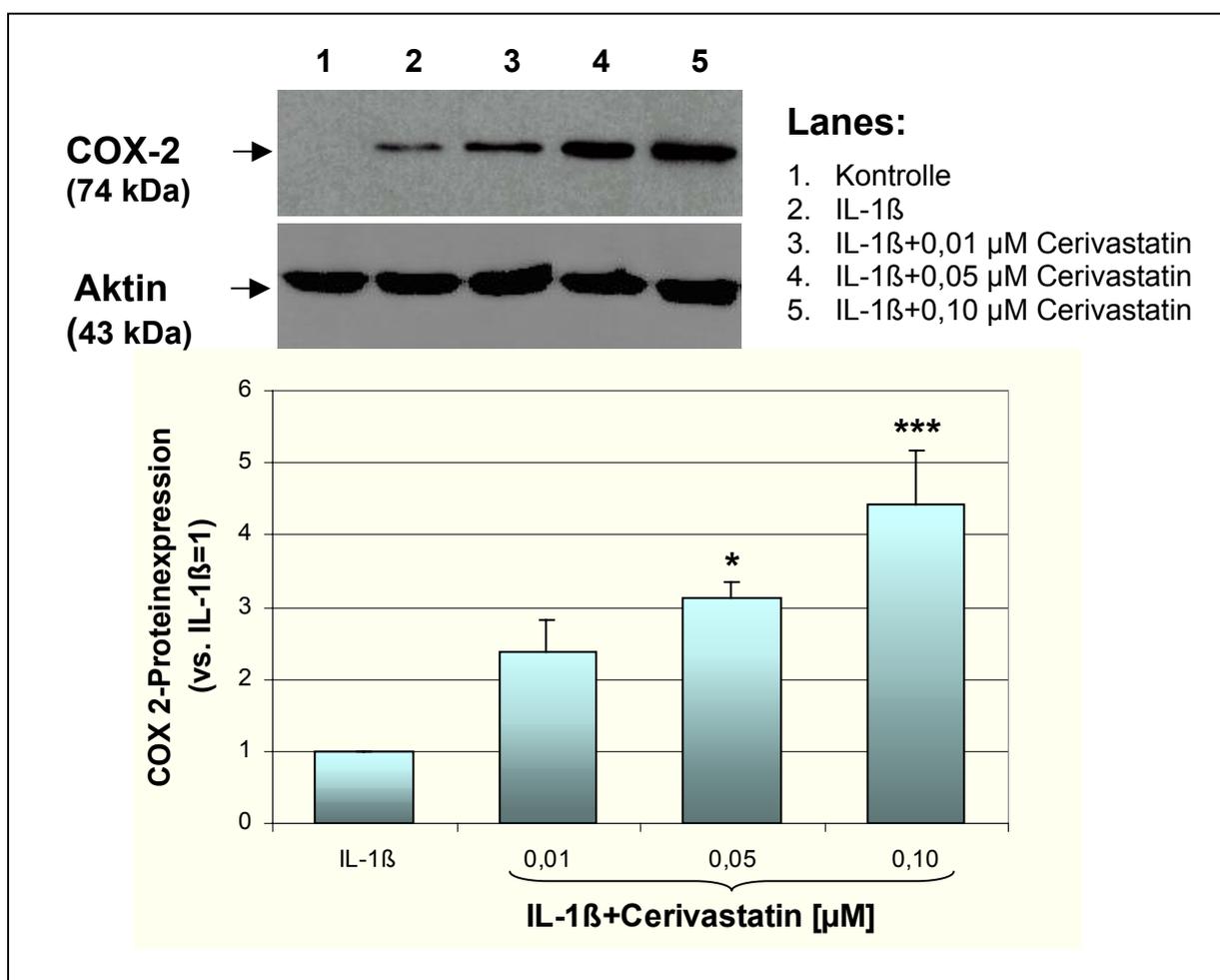


Abbildung 4-33: COX-2-Proteinexpression in mit IL-1 β stimulierten Mesangiumzellen ohne oder mit Cerivastatin-Behandlung. Lysate (je 15 μ g Protein/Lane) von Kontrolle (0,25% FCS) oder mit 0,5 nM IL-1 β stimulierten ohne oder mit Cerivastatin (0,01; 0,05; 0,1 μ M) vorbehandelten Zellen wurden in einem 12%-igen SDS-Gel aufgetrennt und auf PVDF-Membran geblottet. Die Detektion erfolgte mit einem anti-COX-2 -Antikörper und einer nachgeschalteten ECL-Reaktion. Die Proteinexpression von COX-2 wurde densitometrisch ausgewertet und relativ zur Expression eines Referenzproteins (Actin) berechnet. Oben: Repräsentativer Western-Blot. Unten: Densitometrische Analyse. Die Signalstärken sind vs. IL-1 β (=1) angegeben und stellen die Mittelwerte aus drei Experimenten \pm SD, dar. * $P \leq 0,05$; *** $P \leq 0,001$ vs. IL-1 β .

Die Abbildung 4-33 lässt erkennen, dass erst eine Stimulation mit IL-1 β eine sichtbare COX-2-Expression induzierte (Spur 2). Bereits 0,01 μ M Cerivastatin (Spur 3) führte zu einer Expressionssteigerung von COX-2-Protein, unter 0,05 μ M Cerivastatin (Spur 4) wurde eine 3-fache und signifikante ($p \leq 0,05$) und unter 0,1 μ M Cerivastatin (Spur 5) eine 4,4-fache und signifikante ($p \leq 0,001$) Proteinexpression von COX-2 im Vergleich zu Zellen unter IL-1 β gemessen. Somit zeigte Cerivastatin eine potenzierende Wirkung auf die durch IL-1 β -induzierte Expression des COX-2-Proteins.

Einfluss von dem iNOS-Inhibitor L-NMMA auf die COX-2-Proteinexpression

Eine Inkubation der Zellen mit dem NOS Inhibitor L-NMMA führte zu keiner signifikanten Änderung der potenzierenden Wirkung von Cerivastatin auf die COX-2 Proteinexpression (Abb. 4-34).

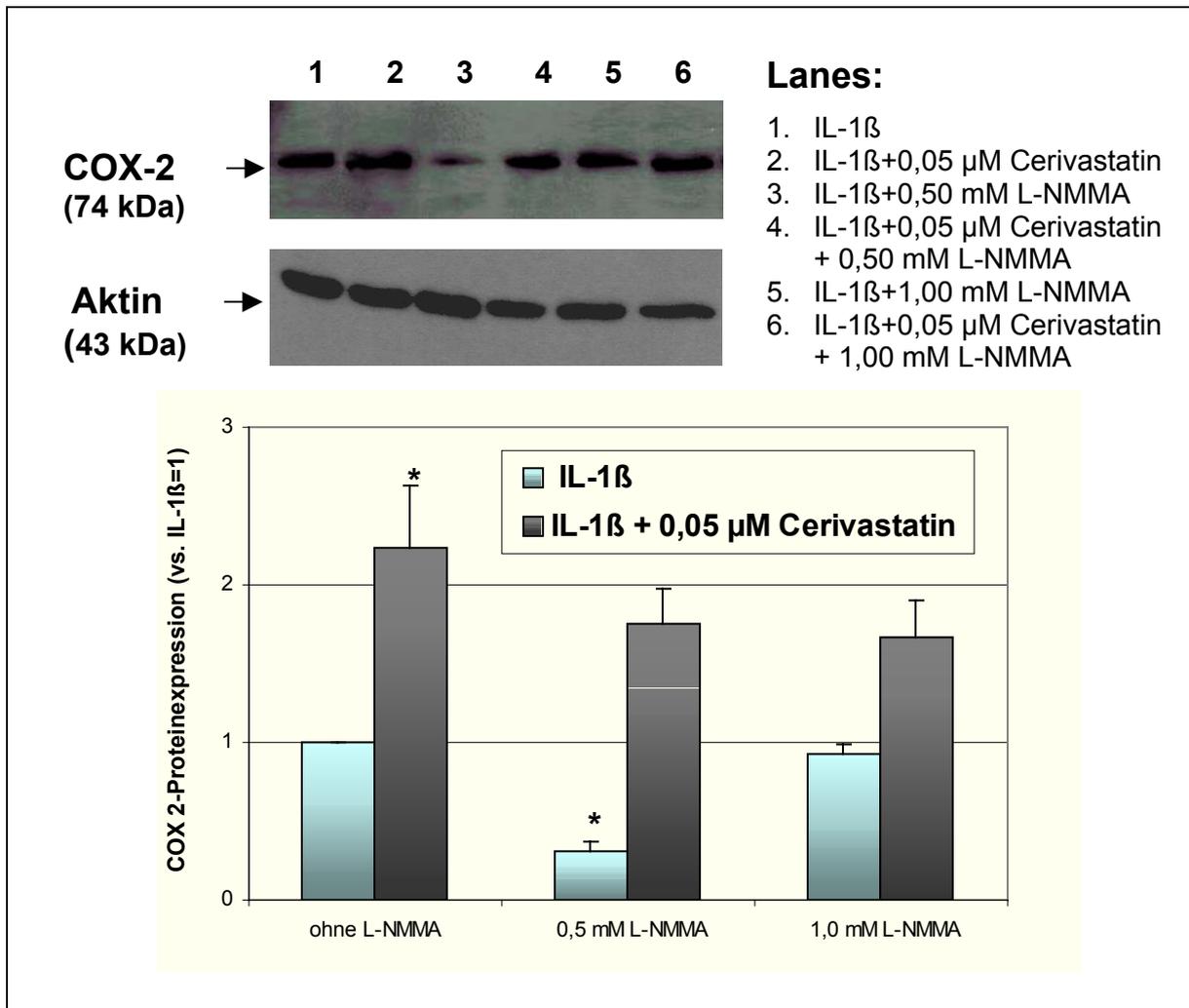


Abbildung 4-34: Einfluss von dem NOS-Inhibitor L-NMMA auf die durch IL-1 β induzierte COX-2-Proteinexpression ohne oder mit Cerivastatin-Behandlung. Lysate (je 15 μ g Protein/Lane) wurden in einem 12%-igen SDS-Gel aufgetrennt und auf PVDF-Membran gebロットet. Die Detektion erfolgte mit einem anti-COX-2-Antikörper und einer nachgeschalteten ECL-Reaktion. Die Proteinexpression von COX-2 wurde densitometrisch ausgewertet und relativ zur Expression eines Referenzproteins (Actin) berechnet. Oben: Repräsentativer Western-Blot. Unten: Densitometrische Analyse. Die Signalstärken sind vs. IL-1 β (=1) angegeben und stellen die Mittelwerte aus drei Experimenten \pm SD, dar. * $P \leq 0,05$ vs. IL-1 (ohne L-NMMA).

Die Proteinexpression von COX-2 nahm bei mit 0,5 mM L-NMMA inkubierten Zellen (Spur 3) im Vergleich zu mit IL-1 β stimulierten Zellen (ohne NOS-Hemmer, Spur 1) signifikant ($p \leq 0,05$) ab. Bei mit Cerivastatin vorbehandelten Zellen (Spur 2) führte L-NMMA nur zu einer leichten aber nicht signifikanten Abschwächung der Bandenintensität (Spur 4, 6).

Einfluss von einem COX-Hemmer auf die COX-2-Proteinexpression

Sowohl Indomethacin (unselektiver COX-Hemmer) als auch Celecoxib (selektiver COX-2 Hemmer) wies eine verstärkende Wirkung auf die Expression von COX-2 Protein auf, obwohl die Prostaglandinbildung durch Celecoxib gehemmt wurde (Abschnitt 4.4.6.1). Die Abb. 4-35 zeigt exemplarisch Ergebnisse von Western-Blots vom Experiment mit Indomethacin.

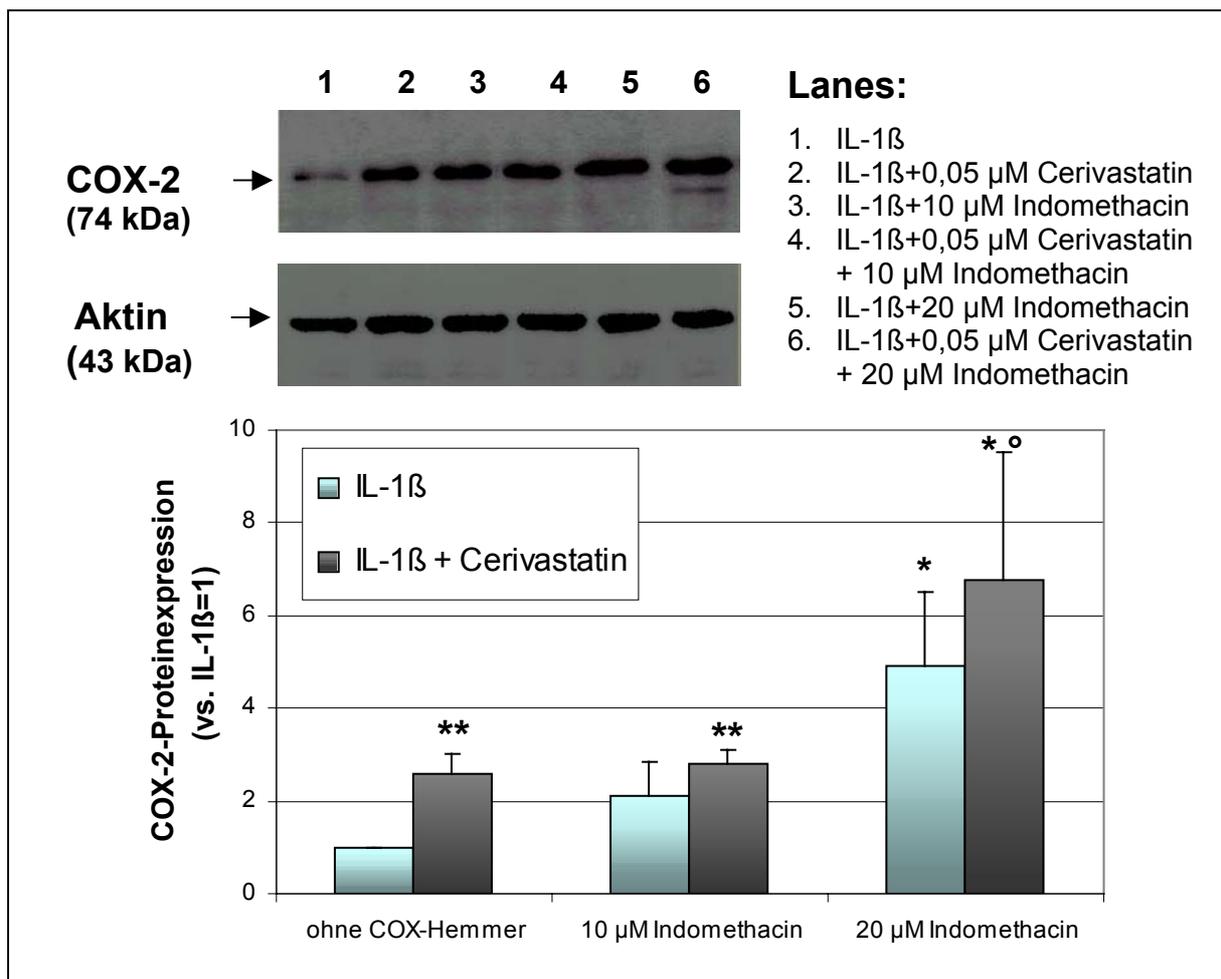


Abbildung 4-35: Einfluss von Indomethacin auf die durch IL-1 β induzierte COX-2-Proteinexpression in Mesangiumzellen ohne oder mit Cerivastatin-Behandlung. Lysate (je 15 μ g Protein/Lane) wurden in einem 12%-igen SDS-Gel aufgetrennt und auf PVDF-Membran geblotet. Die Detektion erfolgte mit einem anti-COX-2-Antikörper und einer nachgeschalteten ECL-Reaktion. Die Proteinexpression von COX-2 wurde densitometrisch ausgewertet und relativ zur Expression eines Referenzproteins (Actin) berechnet. *Oben:* Repräsentativer Western-Blot. *Unten:* Densitometrische Analyse. Die Signalstärken sind vs. IL-1 β (=1) angegeben und stellen die Mittelwerte aus drei Experimenten \pm SD, dar. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$ vs. IL-1 β (ohne COX-Hemmer); ° $P \leq 0,05$ vs. IL-1 β +Cerivastatin (ohne COX-Hemmer).

Beide untersuchten Konzentrationen von Indomethacin (10 und 20 μM) zeigten eine verstärkende Wirkung auf die durch IL-1 β induzierte COX-2 Proteinexpression. Unter 10 μM Indomethacin (Spur 3) wurde eine 2,5-fache (statistisch nicht signifikante) und unter 20 μM Indomethacin (Spur 5) eine 4,7-fache signifikante ($p \leq 0,05$) Expression im Vergleich zu IL-1 β (Spur 1) gemessen. Insgesamt führte die Koinkubation mit IL-1 β und beiden Medikamenten (0,05 μM Cerivastatin + 20 μM Indomethacin, Spur 6) zu einer signifikant ($p \leq 0,05$) gesteigerten COX-2-Expression gegenüber einer Inkubation mit IL-1 β plus Cerivastatin (Spur 2). Im Vergleich zu der Inkubation mit IL-1 β alleine war die COX-2-Proteinexpression unter der o. g. Koinkubation sogar um den Faktor 6,2 stärker.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit diente die mesangiale Zellkultur als ein zelluläres Modell für pathogenetischen Vorgänge bei der Glomerulonephritis in der Niere und für die Vorgänge der chronischen Abstoßungsreaktion in der Transplantatniere. Vom besonderen Interesse war es zu erforschen, welchen Einfluss bestimmte Pharmaka auf die Proliferation der Mesangiumzelle *in vitro* haben. Hierzu erfolgten die Untersuchungen in folgenden Abschnitten:

- Untersuchung der Proliferation der Mesangiumzellen unter dem Einfluss von Immunsuppressiva (IS) Cyclosporin A (CyA), FK-506 (Tacrolimus) und Mykophenolsäure (MPA) als aktiver Metabolit von Mykophenolat Mofetil (MMF).
- Untersuchung der Proliferation der Mesangiumzellen unter dem Einfluss von einem Angiotensin Converting Enzym (ACE)-Hemmer (Ramiprilat) und Angiotensin-II-Rezeptor-1 (AT1)-Rezeptorantagonisten (Valsartan).
- Untersuchung der Proliferation der Mesangiumzellen unter dem Einfluss von einem Statin (Cerivastatin).

In allen Fällen wurde zuerst mit Fetalem Kälberserum (FCS) oder Zytokinen oder Wachstumsfaktoren die mesangiale Zellproliferation ausgelöst, und dann mittels verschiedener Proliferationsassays geprüft, ob die Proliferation der Mesangiumzellen sich durch bestimmte Pharmaka beeinflussen lässt. In weiteren Schritten wurde die Wirkung der Medikamente auf die Aktivität und Expression von bestimmten Genen und Proteinen untersucht, die an der Autoregulation der Mesangiumzelle beteiligt sind.

5.1 Proliferation der Mesangiumzellen unter dem Einfluss von Immunsuppressiva

Alle in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Proliferationsassays (BrdU-Assay, Trypanblau-Test, MTT-Test) zeigten, dass die untersuchten IS (CyA, FK-506 und MPA) einen unterschiedlich hemmenden Effekt auf die Proliferation der Mesangiumzellen aufweisen. Dabei war die inhibitorische Wirkung von CyA eher auf

die Toxizität dieses Medikaments zurückzuführen. Die Analyse der DNA-Synthese im BrdU-Assay ergab, dass CyA eine IC_{50} bei $2,75 \pm 0,14 \mu\text{M}$ erreichte. Das Wachstum der Mesangiumzellen, bestimmt im Trypanblau-Test, wurde unter der Wirkung von $2,5 \mu\text{M}$ CyA um 42% reduziert, gleichzeitig aber betrug die Zytotoxizität bei dieser Konzentration ca. 17%. Ab $5 \mu\text{M}$ erreichte CyA eine Zytotoxizität von ca. 32%. Diese Konzentrationen von CyA liegen schon nicht mehr im therapeutischen Bereich. Laut klinischer Studien (Kahan, 1982; Savoldi und Kahan, 1986; Griffith et al., 1984) betragen optimale CyA-Plasmakonzentrationen von 0,2 bis maximal $1 \mu\text{M}$, um immunsuppressive Effekte zu erreichen.

FK-506 zeigte eine signifikante Wachstumshemmung von 42% erst bei der Konzentration von $10 \mu\text{M}$, war aber weniger toxisch als CyA, die Zytotoxizität bei $10 \mu\text{M}$ FK-506 betrug ca. 16%. Auch diese Konzentrationen von FK-506 befinden sich außer dem klinischen Bereich. Pharmakokinetische Studien (Regazi et al., 1999; Bekersky et al., 1999) berichten, dass die gemessene FK-506-Konzentration im Plasma im Bereich 6-24 nM lagen. Bei diesen Konzentrationen war kein inhibierender Effekt auf die Proliferation von MZ in der vorliegenden Arbeit zu beobachten. Demgegenüber zeigten Experimente von Radeke et al. (1993) einen hemmenden Einfluss von CyA und FK-506 auf die Proliferation der glomerulären Mesangiumzellen in niedrigeren Konzentrationen. Die IC_{50} auf die DNA-Synthese unter CyA lag bei $0,833 \mu\text{M}$ und unter FK-506 bei $1,2 \mu\text{M}$.

Mohacsi et al. (1997) verglichen Wirkung von CyA, FK-506, Rapamycin und MPA auf die Proliferation von glatten Muskelzellen und Endothelzellen und stellten fest, dass nur MPA und Rapamycin inhibierend auf die Proliferation der Zellen im klinischen Bereich und ohne toxische Effekte wirkten. Die inhibierende Wirkung von FK-506 war ausgeprägter bei humanen Zellen, da menschliche Zellen empfindlicher als die von einer Ratte auf immunsuppressive Medikamente reagieren sollen. Dies stellten u. a. Hauser et al. (1999) fest, die IC_{50} von MPA wurde bei Rattenmesangiumzellen bei einer Konzentration von $0,45 \pm 0,13 \mu\text{M}$ und bei humanen Zellen bei $0,19 \pm 0,06 \mu\text{M}$ erreicht.

In der hier vorliegenden Arbeit bewies sich nur MPA als proliferationshemmendes und nicht toxisches Immunsuppressivum, das im therapeutischen Bereich wirkt. MPA inhibierte DNA-Synthese mit einer IC_{50} bei einer Konzentration von $0,52 \pm 0,02 \mu\text{M}$.

Die Behandlung der Mesangiumzellen mit 1,25 μM MPA reduzierte das Wachstum um 90%, wobei keine Zytotoxizität bis zu Konzentration 10 μM nachgewiesen wurde. Dies deckt sich mit den Befunden anderer Arbeitsgruppen, die eine hemmende Wirkung von MPA in therapeutisch relevanten Konzentrationen auf Mesangiumzellen sowohl aus Ratte als auch aus Menschen fanden (Renders et al., 1997; Ziswiler et al., 1998; Hauser et al., 1999; Dubus et al., 2002). Auch in diesen Versuchen wurde keine Toxizität von MPA bis 10 μM festgestellt. Hauser et al (1999) konnten in dem Bereich bis 10 μM MPA keine Apoptose nachweisen.

5.1.1 Zelluläre und molekulare Wirkmechanismen von CyA und FK-506

Es ist bekannt, dass CyA und FK-506 über eine Interaktion von Medikament-Immuno-philin-Komplex mit Calcineurin-Calmodulin die Phosphataseaktivität von Calcineurin hemmen und dadurch die Translokation von NF-ATc in den Zellkern blockieren, und so inhibierend auf die Expression von IL-2 und von Rezeptoren für IL-2 bei T-Zellen wirken (Clipstone & Crabtree 1992, 1993, Liu et al. 1991, 1992, 1993, O'Keefe et al. 1992, Fruman et al. 1992, Flanagan et al. 1991).

Vielen Berichten zufolge führt eine Langzeittherapie mit IS zu einer akuten oder chronischen Schädigung der Niere durch unerwünschte nephrotoxische Wirkungen. Mehrere Untersuchungen weisen darauf hin, dass eine akute und chronische Medikation mit CyA oder FK-506 eine Reduktion des renalen Plasmaflusses (RPF), einen Rückgang der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und der *single nephron* glomerulären Filtrationsrate (SNGFR) verursacht (Demetris et al., 1991; Shapiro et al., 1993; Nalesnik et al., 1987; Barros et al., 1987, 1990, Hadad et al., 1995). Diese Effekte werden auch als Ursache der nephrotoxischen Wirkung beider IS an Mesangiumzellen angesehen.

In der vorliegenden Arbeit konnte festgestellt werden, dass die proliferationshemmende Wirkung von CyA mit einer Toxizität verbunden war. Befunde mehrerer Studien ergaben, dass CyA die hormonell stimulierte Kalzium-Mobilisierung (Ca^{2+}) modifizieren und die Kontraktion so gut wie die Proliferation der renalen Mesangiumzellen beeinflussen kann (Kremer et al., 1989; Pfeilschifter, 1988; Martin et al., 1988; Skorecki et al., 1992).

Als weitere mögliche Ursache der Nephrotoxizität von CyA wird eine Imbalance zwischen vasokonstriktorisch und vasodilatatorisch wirkenden Prostaglandinen zu Gunsten der Vasokonstriktion gesehen. So wurde beispielsweise in den Studien von Perico et al. (1986a,b) eine verstärkte Synthese des renalen vasokonstriktiven TXA₂ bei mit CyA behandelten Ratten beobachtet. Darüber hinaus wurde eine Reduktion der vasodilatatorisch wirkenden PGE₂ unter dem Einfluss von CyA bei mit vasoaktiven Agonisten wie Ang II oder Vasopressin stimulierten Mesangiumzellen festgestellt (McCauley et al., 1991). Hingegen zeigte FK-506 keine Wirkung auf die PGE₂-Produktion. Dies könnte auch eine Erklärung sein, warum in der vorliegenden Arbeit CyA stärker proliferationshemmend und toxischer als FK-506 auf die MZ wirkte.

Die Untersuchungen von Martin et al. (1994a) zeigten einen hemmenden Effekt von CyA auf mit IL-1 β oder LPS induzierte COX-2-mRNA und Proteinexpression. Die Cyclooxygenase-2 stellt ein Schlüsselenzym der Prostaglandinbildung dar, und aufgrund der Induzierbarkeit durch mitogene und inflammatorische Reize spielt sie eine wichtige Rolle bei der Mitogenese und in entzündlichen Prozessen (Hershman, 1994).

Eine Untersuchung der Expression von COX-2 in mit PDGF-BB stimulierten Mesangiumzellen konnte nur eine aktivierende Wirkung von PDGF-BB auf die COX-2-Genexpression nachweisen, dabei wurden keine Änderungen unter dem Einfluss der verwendeten IS beobachtet (Ergebnisse werden nicht aufgezeigt).

In vitro Versuche von Hamond und Kind (1995) zeigten, dass eine Inkubation der Zellen mit FK-506 eine vermehrte Freisetzung von Endothelin-1 bewirkte. Endothelin-1 (ET-1) gehört zu vasokonstriktorisch wirkenden Peptiden und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der renalen Hämodynamik. Dieses Peptid kann auch die mesangiale Zellproliferation sowie die mesangiale Produktion von extrazellulärer Matrix und Zytokinsekretion beeinflussen (Simonson, 1993). Weiterhin ist in vielen Untersuchungen beschrieben, dass ET-1 die intrazelluläre Ca²⁺ Konzentration erhöht und verschiedene Proteinkinase-Kaskaden einschließlich der Proteinkinase C, der Tyrosinkinase und der MAP-Kinase in Mesangiumzellen aktiviert (Isono et al., 1998; Araki et al., 1997; Haneda et al., 1995; Sugimoto et al., 1993). Sugimoto et al. (2001) zeigten, dass CyA über eine Blockierung des Calcineurin-abhängigen *nuclear factor of activated T-cells 2* (NFAT2) die mit ET-1

induzierte COX-2 Expression bei Mesangiumzellen inhibierte. Dabei wird die durch ET-1 stimulierte COX-2-Induktion als negativer Feedback-Mechanismus auf die mesangiale Zellkontraktion und das Wachstum durch Freisetzung von vasodilatorischen Prostaglandinen wie PGE₂ gesehen, die die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) Signalübertragung aktivieren (Hughes et al., 1995; Bornfeldt et al., 1997). Die Aktivierung der cAMP-Proteinkinase A Signalübertragung kann bei Mesangiumzellen eine Wachstumshemmung über eine verminderte Aktivität von MAP-Kinasen bewirken (Haneda et al., 1996; Togawa et al., 1997).

Wolf et al. (1995a) halten die durch CyA verstärkte Synthese von TGF- β 1 für einen möglichen Mechanismus für die antiproliferativen Effekte in kultivierten proximalen Tubuluszellen und für die gleichzeitig entstehende Aktivierung von Fibroblasten im Tubulointerstitium, was letztlich zur Fibrose und tubulären Atrophie in der Niere führen kann. Auch bei Mesangiumzellen führt eine Inkubation mit CyA zu einer Hochregulierung des TGF- β und dessen Rezeptoren Typ I und Typ II (Waiser et al., 2002). Ebenso wurde eine höhere intrarenale Expression von TGF- β sowie von anderen fibrogenischen Genen nach einer Therapie mit FK-506 beobachtet: Kollagen, Fibronectin, Metalloproteinase (MMP-2), *tissue inhibitor of metalloproteinase-2* (TIMP-2) und Osteopontin (Khanna et al., 2002, 2003). Arbeiten von Khanna an humanen T-Zellen und A549-Zellen (humane adenocarcinoma Lungenzellen) bewiesen, dass sowohl CyA als auch FK-506 das p21WAF/CIPWAF/CIP 1 (*Cyclin Inhibitor*) via TGF- β -Sekretion induzieren. Auch bei diesen Versuchen wurde eine Inhibition der p21WAF/CIP1-Induktion nach einer Koinkubation mit einem anti-TGF- β Antikörper beobachtet (Khanna et al., 2002; Khanna, 2003).

In der vorliegenden Arbeit konnten keine supprimierenden Effekte von FK-506 in dem therapeutischen Bereich auf die Proliferation der Mesangiumzellen festgestellt werden. Mehrere Wissenschaftler berichteten, dass unter FK-506-Medikation histopathologische Veränderungen wie bei der mesangioproliferativen GN in der Niere beobachtet werden: Eine verstärkte Proliferation von Mesangiumzellen, eine intensivere mesangiale Matrixproduktion und eine tubuläre Vakuolenbildung (Wijnen et al., 1991; Yamaguchi, 1991; Demetris et al., 1991). Versuchsergebnisse von Muracka et al. (1996) wiesen eine aktivierende Wirkung von FK-506 auf die durch

NF- κ B induzierte IL-6 Produktion *in vivo* und *in vitro* nach. NF- κ B gilt als ein induzierbarer Transkriptionsfaktor für Zytokine wie IL2, IL-6 oder IL-8. Nach vielen Untersuchungen kann IL-6 *in vitro* die Proliferation von Mesangiumzellen induzieren und deren Matrixproduktion verstärken (Horii et al., 1989), und *in vivo* renale Krankheiten wie eine mesangioproliferative Glomerulonephritis auslösen (Horii et al., 1989; Brandt et al., 1990; Fattori et al., 1994; Suematsu et al., 1989). Im Gegensatz dazu kann CyA NF- κ B nicht aktivieren, sondern hemmen und soll zelluläre Veränderungen im Bereich der Tubuli, aber keine mesangioproliferative Glomerulonephritis hervorrufen (Demetris et al., 1991; Rosen et al., 1990).

Vor dem Hintergrund der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente für das Proliferationsverhalten der Mesangiumzellen stellte sich also heraus, dass die wachstums- und DNA-synthesehemmende Wirkung von CyA mit der Toxizität an der Zelle verbunden ist und im therapeutischen Konzentrationsbereich nicht relevant ist. FK-506 stellt demgegenüber ein wenig toxisches, aber für die Mesangiumzelle auch nicht wesentlich proliferationshemmendes Medikament dar.

5.1.2 Zelluläre und molekulare Wirkung von MPA

Die immunsuppressive Wirkung von MPA besteht in der Inhibierung der Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH), eines Schlüsselenzyms in der Umwandlung von Inosin- zu Guanosinmonophosphat, wodurch es zu einer Verminderung des Guanosinnukleotid-Pools kommt und die Proliferation der B- und T-Lymphozyten gehemmt wird (Allison und Eugui, 1993).

Mehrere Untersuchungen ergaben, dass MPA eine inhibierende Wirkung auch auf die Proliferation der nicht lymphatischen Zellen wie vaskulären Muskelzellen, Endothelzellen und Mesangiumzellen ausübt (Mohacsi et al., 1997; Renders et al., 1997; Ziswiler et al., 1998; Hauser et al., 1999; Dubus et al., 2002). Bislang wurde angenommen, wie Studien von Hauser et al. (1999) zeigten, dass antiproliferative Effekte von MPA auf Mesangiumzellen ähnlich wie bei Lymphozyten infolge der Verminderung des Guanosinnukleotid-Pools durch eine Hemmung der *de-novo* Purinsynthese auftraten. Die durch MPA ausgelöste Inhibition der Proliferation von MZ war reversibel und konnte durch Zugabe von exogenem Guanosin aufgehoben werden. In einer Studie von Huwiler et al. (2000) konnte jedoch gezeigt werden, dass

eine Inkubation der MZ mit Zusatz von extrazellulären Nukleotiden zur Aktivierung von MAPK-Kaskade (*mitogen activated protein kinase*) führte. Da nicht lymphatische Zellen nicht nur auf die *de novo-Purinsynthese* angewiesen sind sondern auch über *salvage pathway* verfügen, ist zu erwarten, dass MPA nicht nur über die Inhibierung der IMPDH zur Proliferationshemmung solcher Zellen führt. Neuere Untersuchungen lieferten Beweise, dass MPA die mit IL-1 β induzierte IL-6-Expression der renalen tubulären Epithelzellen inhibierte (Baer et al., 2004). In Experimenten von Dubus et al. (2002) zeigte MPA neben der proliferationsinhibierenden Wirkung auf humane Mesangiumzellen auch eine Hemmung der mit FCS oder TGF- β stimulierten Matrixprotein-Produktion nämlich von Collagen I-mRNA und -Protein, und der Expression des Fibronektin-Proteins.

Ein der Ziele der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob MPA zusätzlich via andere Signalwege als IMPDH-Inhibierung proliferationshemmend auf die MZ wirkt. Vom besonderen Interesse war es zu prüfen, ob möglicherweise MPA die autokrine Synthese von PDGF-B beeinflussen kann. PDGF gilt als Haupt-Mitogen sowohl bei proliferativen Formen der Glomerulonephritis als auch bei Abstoßungsreaktion in der Transplantatniere (Gesualdo et al., 1991; Niemir et al., 1995; Yoshimura et al., 1991; Floege et al., 1993). In der Zellkultur wurde gezeigt, dass Mesangiumzellen nach der Stimulation mit PDGF-BB proliferieren und selber auch PDGF-BB produzieren (Abboud et al., 1987; Floege et al., 1991a; Shultz et al., 1988). Inkubation der Mesangiumzellen mit anderen Faktoren u. a. EGF (*epidermal growth factor*), TNF α (*tumor necrosis factor α*) oder BFGF (*basic fibroblast growth factor*) führt bei MZ auch zur PDGF-mRNA- und Protein-Induktion, was beweist, dass PDGF eine kritische Rolle als autokriner Wachstumsfaktor für die Proliferation der MZ darstellt (Silver et al., 1989).

Die mitogene Wirkung von PDGF-BB wurde auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt: Der BrdU-Einbau in die DNA der proliferierenden Mesangiumzellen wurde 48 h nach der PDGF-BB-Stimulation um den Faktor 3,5 gesteigert im Vergleich zur Kontrolle ohne Stimulus. Auch die autokrine Produktion von PDGF-B wurde mittels RT-PCR und Western-Blot bewiesen. MPA erwies sich in der gesamten Zeitkinetik der mit PDGF-BB ausgelösten PDGF-B-Genexpression (1 bis 12 h) als wirksamer Inhibitor. Die PDGF-B mRNA *steady state levels* von Zellen, die mit PDGF-BB im

Medium mit reduziertem FCS-Gehalt (0,5%) stimuliert worden waren, erreichten unter MPA (2,5 μ M) das Niveau der unstimulierten Kontrollen. Diese Befunde korrelieren mit den Untersuchungen der Proliferation, die ergaben, dass das Wachstum der MZ unter MPA ab Konzentration 1,25 μ M nur 10% betrug und DNA-Synthese ab 1,25 μ M MPA komplett gehemmt wurde. Auch im Western-Blot Verfahren untersuchte Proteinsynthese von PDGF-B wurde unter dem Einfluss von MPA konzentrationsabhängig reduziert. Übertragen auf den proliferationsfördernden Effekt von PDGF-BB am Mesangium lässt sich der proliferationshemmende Einfluss von MPA an Mesangiumzellen teilweise auf die Suppression der Gen- und Proteinexpression von PDGF-B zurückzuführen.

Durch die Anbindung von PDGF-BB an seinen Rezeptor wird dieser dimerisieren und durch die Autophosphorylierung aktiviert. Als Folge werden verschiedene Signaltransduktionswege initiiert, die zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren führen (Abboud et al., 1995; Heldin et al., 1998; Albert et al., 1995). So kann PDGF-BB eine Aktivierung von heterotrimerischen G-Proteinen und der sogenannten *small*- G-Proteinen wie Ras, Rac oder Rho auslösen (Bar-Sagi und Hall, 2000). Im Einklang mit unseren Ergebnissen wurde auch für einen anderen IMPDH-Inhibitor, den Tiazofurin, gezeigt, dass er die Expression von heterotrimerischen G-Proteinen und der sogenannten *small*- G-Proteinen unterdrücken konnte (Olah et al., 1988, 1990; Kharbanda et al., 1990).

Weitere Versuche der vorliegenden Arbeit konzentrierten sich auf die Untersuchung der Genexpression der *Immediate-Early-Gene* (IEG): Egr-1 und c-fos. Grundlegend dafür waren Untersuchungen, die darauf hinwiesen, dass eine Egr-1-Induktion sowohl nach einer mitogenen Stimulierung von Mesangiumzellen in Kultur erfolgt als auch in der proliferativen Anti-Thy-1.1-Nephritis *in vivo* als pathogenetischer Faktor auftritt (Rupprecht et al., 1992, 1993, 1997), und dass eine signifikant verstärkte Expression von Protoonkogenen solchen wie c-fos und c-myc bei Patienten mit Lupus Nephritis, IgA Nephritis und der fokalen segmentalen Sklerosis detektiert wurde (Takemura et al., 1996). Ergebnisse mehrerer Untersuchungen konnten nachweisen, dass Egr-1 an der transkriptionellen Regulation vieler Gene u. a. von PDGF-B teilnimmt (Khachigian et al., 1994; 1995; 1996; 1997; Liang et al., 1996).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine signifikante Egr-1-Expression auf der transkriptionellen Ebene nach der Stimulation mit dem mitogen wirkenden PDGF-BB nachgewiesen. Eine Behandlung der Mesangiumzellen mit MPA (2,5 μ M) führte zu einer Hemmung der durch PDGF-BB induzierten Expression von Egr-1. Auch die Egr-1-Expressionshemmung könnte die autokrine PDGF-B-Expression herabsetzen und so zu der beobachteten Proliferationshemmung der MZ unter MPA beitragen.

Darüber hinaus spielt Egr-1 eine wichtige Rolle bei der Regulation der Expression von Thymidinkinase-Gen, dessen Produkt die Thymidinkinase (TK) an der DNA-Synthese teilnimmt (Molnar et al., 1994). So könnte die in der vorliegenden Arbeit festgestellte Hemmung der Egr-1-Expression unter MPA ebenso zu der Reduktion der DNA-Synthese beitragen.

Dem Bericht von Guillemot et al. (2001) zufolge kann Egr1 auch die Expression von Zyklin D1 via eine Aktivierung und eine spezifische Interaktion mit der Promotorregion von dem Zyklin D1 hochregulieren. In Tierexperimenten an einem Modell der anti-Thy1-mesangioproliferativen Nephritis wurde gezeigt, dass eine Behandlung mit MPA in einer reduzierten mRNA-Expression von Zyklinen: B, D1, D2, D3 sowie in einer erhöhten mRNA-Expression von dem Zyklin-Inhibitor p27^{kip1} resultierte (Chiara et al., 2005). Möglicherweise kann die unter MPA reduzierte Egr-1-Expression zu einer Inhibierung der D1-Expression führen. Dazu werden die Zyklin-*cyclin-dependent-kinase* (CDK) Komplexe durch die CDK-Inhibitoren wie p27 gehemmt. Als weitere Folge bleibt das Retinoblastoma-Protein (pRb) unterphosphoryliert und aktiv, somit kann der Transkriptionsfaktor E2F nicht freigesetzt und aktiviert werden (siehe Abschnitt 5.2.2, Seite 153), und die Proliferation der Zellen kann nicht fortschreiten.

Eine signifikante Induktion von c-fos-mRNA nach der PDGF-BB Stimulation konnte auch in der vorliegenden Arbeit mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Maximale c-fos-mRNA *steady state levels* wurden nach 30 min gemessen (vgl. Schäfer et al., 1996; Kreisberg et al., 1994; Rupprecht et al., 1993; Schultze-Lohoff et al., 1993). Nach 2 Stunden war die c-fos-Genexpression bei mit PDGF-BB stimulierten Zellen im Vergleich zu der Expression nach 30 min weniger aber im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen immer noch signifikant höher, und gerade zu diesem

Zeitpunkt war eine signifikante Hemmung der c-fos-Expression unter dem Einfluss von MPA festzustellen.

Es ist zu vermuten, dass die Reduktion der Expression von Egr-1 und c-fos durch MPA wahrscheinlich eine Folge einer reduzierten Aktivität der durch PDGF-BB induzierten Signalwegen sein kann (Abb. 5-1). Dabei müssten verschiedene Signalwege daran beteiligt sein, denn während ein hemmender Effekt unter MPA auf die Egr-1-Expression schon nach 30 min zu beobachten war, trat die Expressionshemmung von c-fos erst nach 2 h ein. Kawano et al. (2003) konnten nachweisen, dass die durch PDGF-BB stimulierte ERK, JNK und p38 Signalwege unterschiedliche Rollen für die mesangiale Proliferation und Genexpression spielen. Diese Autoren stellten u. a. fest, dass sowohl ERK- als auch JNK-Signaltransduktion zu der Proliferation von MZ beitragen kann. Die durch PDGF-BB induzierte transkriptionelle Aktivität von AP-1 soll über JNK und p38 aber nicht über ERK vermittelt werden.

Mit Hilfe des EMSA wurde in dieser Arbeit auch eine aktivierende Wirkung von PDGF-BB auf die DNA-Bindungsaktivität von AP-1 nachgewiesen (1 und 2 h nach Stimulation), es konnten aber keine hemmenden Effekte der mit PDGF-BB induzierten AP-1-Aktivität unter MPA bis 2 h detektiert werden. Für den Nachweis von AP-1 wird eine Oligonukleotid-Sonde mit Consensussequenz, an die die AP-1/Jun-Komponente bindet, verwendet. Auf diese Weise können sowohl fos/Jun-Heterodimer als auch Jun/Jun-Homodimer im EMSA erfasst werden. Da die Hemmung der c-fos-Expression auf der transkriptionellen Ebene unter MPA erst nach 2 h detektiert wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass der hemmende Effekt von MPA auf den AP-1 c-fos/c-Jun Komplex mit der angewendeten Sonde in einem Zeitraum bis 2 h nicht nachweisbar war. Dem kurzdauernden MPA-Effekt, Hemmung der c-fos-Expression, könnte jedoch trotzdem partiell eine Suppression der PDGF-B-Expression und der mesangialen Proliferation folgen.

Es wurde beschrieben, dass die Expression der beiden Komponenten von AP-1 via verschiedene Transduktionskaskaden reguliert werden. Während die Transkription von c-Jun über JNK und p38 Signalwege aktiviert werden soll, findet die Aktivierung der Transkription von c-fos über JNK, p38, ERK und *90-kDa ribosomal S6 kinase* (p90^{rsk}) statt (Karin, 1995; Hipskind & Bilbe, 1998).

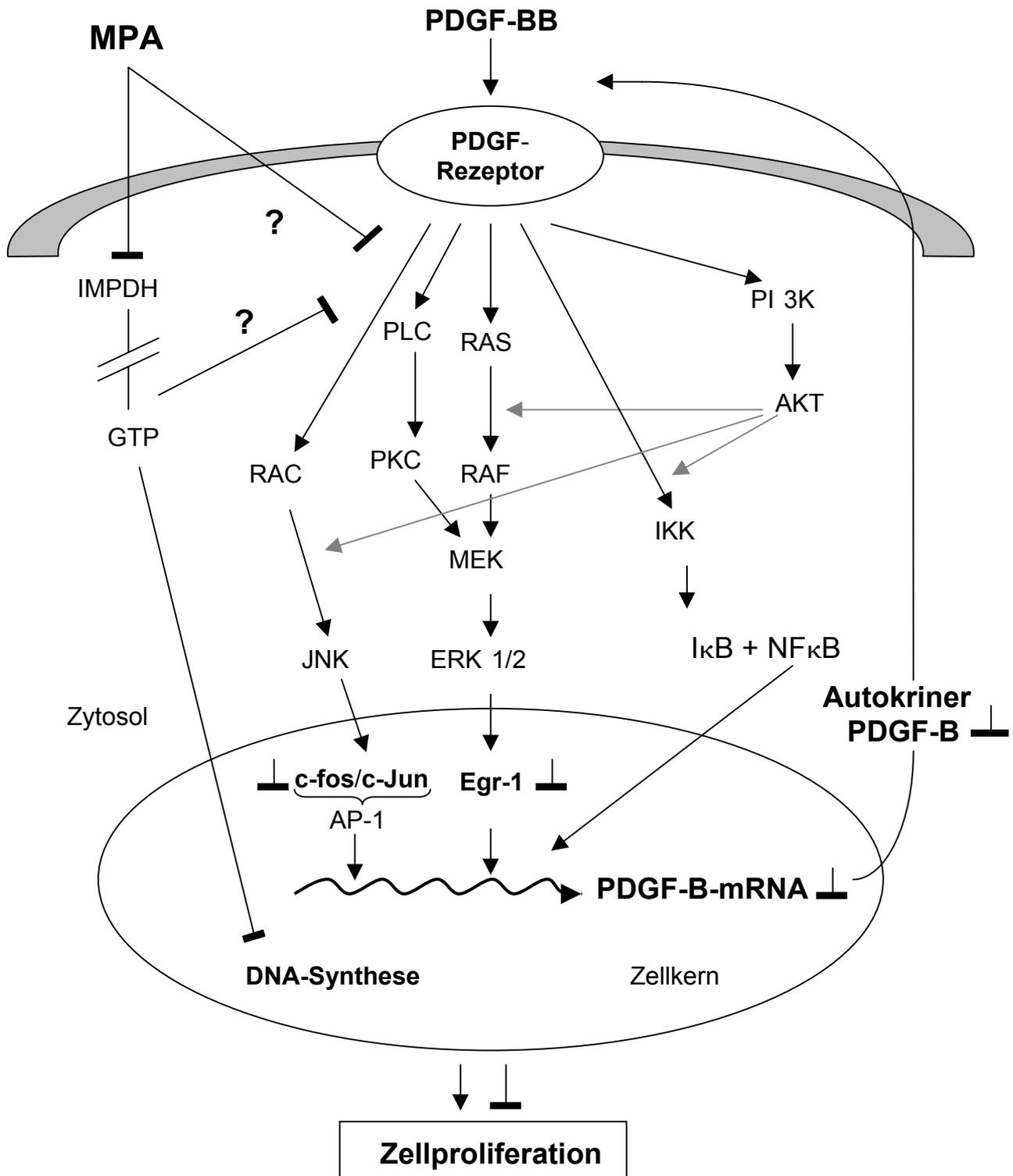


Abbildung 5-1: PDGF-BB induzierte (↓)Signalübertragung und Inhibierungswege von MPA (⊥) an MZ. IMPDH: Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase, GTP: Guanosin-5'-triphosphat, PI 3K: Phosphatidylinositol 3-Kinase, Akt auch Akt/PKB genannt: Akt/Proteinkinase B, IKK: Inhibitorische Kappa B Kinase, NFκB: nuclear factor-κB, MAPK: mitogenaktivierte Proteinkinase, ERK: extracellular signal-activated kinase, PLC: Phospholipase C, PKC: Proteinkinase C, JNK: c-Jun N-terminal-Kinase, AP-1: activator protein-1 .

Des Weiteren wird AP-1 auch posttranslational via eine Phosphorylierung von c-Jun durch JNK und von c-fos durch Ras-abhängige Frk und ERK reguliert (Karin, 1994; Chen et al., 1993). Dabei kann eine kooperative Phosphorylierung von c-fos durch ERK und p90^{rsk} eine Repression der c-fos-Aktivität bewirken. Die Befunde der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass wahrscheinlich nur die Signalwege, die die Transkription von c-fos induzieren, durch MPA beeinflusst werden, während die Transkription von c-Jun und AP-1-Aktivität durch MPA sich nicht beeinflussen lässt.

Es wurde berichtet, dass die Genexpression von c-fos auch durch die PI-3-Kinase reguliert wird (Hu et al., 1995). Der genaue Mechanismus, durch den eine PI-3-Kinase-Kaskade-Aktivierung die Zellen zur DNA-Synthese anregt, ist aber bis jetzt noch nicht genau bekannt. Ein der *down-stream* Zielproteine der PI 3-Kinase stellt die Akt-Serin-Threonin-Kinase dar, die das Überleben vieler Zellen durch eine Inhibition der Aktivität von proapoptotischen Proteinen reguliert. Interessante Ergebnisse lieferte Choudhury (2001), der zeigte, dass eine Inhibition von Akt zur Reduktion von der Elk-1 abhängigen c-fos Transkription und zur vollständigen Hemmung der DNA-Synthese bei mit PDGF stimulierten Mesangiumzellen führte, während eine Blockade der MAPK nur partiell die mit PDGF-induzierte DNA-Synthese inhibierte. Des Weiteren ergaben die Untersuchungen von Choudhury, dass die Akt-Kinase die PDGF-induzierte DNA-Synthese durch die Regulation der *Cyclin-dependent-kinase 2* (CDK2)-Aktivität und durch die Inhibition der Transkription von p27^{Kip1} Cyklin-Kinase-Inhibitor reguliert.

In einer Studie von Guha und Mackman (2002) wurde gezeigt, dass die durch Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte Aktivierung des PI 3K-Akt Signalwegs negativ die Transkription von Egr-1, AP-1 und NF- κ B regulierte, und daraus eine Reduktion der Expression von TNF- α und TF (*tissue factor*) resultierte. Es wurde bewiesen, dass die Inhibition der Expression von Transkriptionsfaktoren: NF κ B, AP-1 und Egr-1 infolge der Inaktivierung von MAPK (ERK1/2, p38 und JNK) und NF κ B Signalwegen durch aktive PI 3-Akt Signalwege via Phosphorylierung von Raf-1, I- κ B Kinase, GSK-3 β (*glycogen synthase kinase-3 β*) und MEKK3 stattfand.

Ob ein *down-stream* Signalweg negativ oder positiv durch die Aktivierung der Akt-Kinase reguliert wird, hängt anscheinend davon ab, über welchen Rezeptor die Aktivierung vermittelt wurde. Mehrere Studien (Jones et al., 2001a, b; Hirschfeld et

al., 2001; Carl et al., 2002; Toshchakov et al., 2002) belegen, dass bei Makrophagen unterschiedliche intrazelluläre Signalwege nach der Aktivierung von *Toll-like receptor 2* (TLR2) oder *Toll-like receptor 4* (TLR4) in Gang gesetzt wurden. Zum Beispiel wurde die transaktivatorische Aktivität von p65 (eine Komponente von NF κ B) durch die TLR2-abhängige Akt-Kinase Aktivität bei humanen Monozyten positiv reguliert (Arbibe et al., 2000). Im Gegenteil führte eine Aktivierung der TLR4-abhängigen Akt-Kinase-Signalkaskade zu einer Beschränkung der transaktivatorischen Aktivität von p65 (Guha & Mackman, 2002).

Die proliferationshemmende Wirkung mancher Medikamente besteht in der Blockierung der PDGF β - Rezeptoren. In einer Studie von Gesualdo (1994) wurde eine Korrelation zwischen dem antiproliferativen Effekt von Trepidil, einem Aggregationshemmer für Thrombozyten, auf Mesangiumzellen und der kompetitiven Antagonisierung der Bindung von PDGF-BB an seinen Rezeptor und dem Modulieren des β -Rezeptor-Transkription-Levels festgestellt. Darüber hinaus führte eine Blockierung der Autophosphorylierung des PDGF-Rezeptors z. B. mit Genistein, einem etablierten Inhibitor der Tyrosin-Kinase zur Expressionshemmung von c-fos (Zwiller et al., 1991; Hill et al., 1990). In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch keine signifikanten Änderungen der Protein-Expression von PDGF- β -Rezeptor nach MPA-Behandlung nach 24 h im Western-Blot nachgewiesen. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass MPA proliferationshemmend auf die MZ wahrscheinlich ohne eine Modifikation der Expression von PDGF- β -Rezeptor wirkt. Auch die Tatsache, dass eine Hemmung der c-fos-mRNA-Expression erst nach 2 h sichtbar war, spricht gegen die eventuelle Modulation des Rezeptors durch MPA.

Für die Expression von Egr-1 ist außerdem die Autophosphorylierung von Tyrosin am PDGF-Rezeptor nicht erforderlich, denn, wie eine Studie von Mundschau et al. (1994) zeigte, fand die durch PDGF-BB induzierte Egr-1 Genexpression trotz der Hemmung der Tyrosin-Kinase Aktivität durch Genistein statt. Auch eine Hemmung der *second messenger* Protein-Kinase C (mit Staurosporine, Calphostin C oder chronische Behandlung mit Phorbol ester) und Phospholipase C (mit D609) konnte die durch PDGF-BB induzierte Transkription von Egr-1 nicht beeinflussen. Dies beweist auch, dass die Autophosphorylierung des PDGF- β -Rezeptors nicht den einzigen Weg darstellt, durch den PDGF-BB die Genexpression von Egr-1 induziert

und die Zellen zu DNA-Synthese anregt. Eine Aufhebung der mit PDGF induzierten Expression von Egr-1 konnte durch eine Hemmung der ERK1/2 mit einem ERK1/2 Inhibitor U-0126 bei humanen glatten Muskelzellen aus dem Respirationstrakt erzielt werden (Hjoberg et al., 2004).

Hauser et al. (1999) führten parallel zu den Proliferationsversuchen Untersuchungen durch, ob MPA eine früh aktivierte GTP-abhängige Signalübertragung in Mesangiumzellen beeinflussen kann, und stellten fest, dass die mit ATP stimulierte Ca^{2+} -Freisetzung, die normalerweise über Purinrezeptoren vermittelt wird und nach deren Bindung an trimere GTP-Bindungsproteine stattfindet, durch eine Präinkubation mit MPA nicht geändert wurde. Aufgrund dieser Ergebnisse ist es wahrscheinlich, dass die in der vorliegenden Arbeit beobachtete inhibierende Wirkung von MPA auf die Expression von PDGF-B, c-fos und Egr-1 unabhängig von einem früh aktivierten GTP-abhängigen Signaltransduktionsweg sein kann.

Darüber hinaus kann nach derzeitig vorliegenden Ergebnissen nicht eindeutig geklärt werden, ob für eine Aktivierung der *upstream*-Kaskaden, die zu Induktion von IEG führen, eine Mobilisierung von intrazellulärem Calcium eine entscheidende Rolle spielt. Whiteside et al. (1998) stellte eine Hypothese, dass intrazelluläres Calcium eine wichtige Rolle für die Stimulation der Proliferation von Mesangiumzellen spielen sollte. Diese Gruppe zeigte dass eine Chelation des intrazellulären Calciums mit 1,2-bis-(2-aminophenoxy)-ethane-N,N,N',N'-tetra-acetic acid (BAPTA) zu einer Hemmung des Thymidineinbaus der proliferierenden Zellen führte und die c-fos-Genexpression bei Stimulation mit Endothelin oder PDGF-BB inhibierte. Wurde aber die Zellproliferation mit FCS ausgelöst, waren die hemmenden Effekte nur partiell. Diesen Ergebnissen gegenüber ergab eine Untersuchung von Nishimura et al. (1992), dass zu der Induktion von c-fos oder c-myc, ein Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration keine Voraussetzung ist. Es wurde gezeigt, dass die durch PDGF-BB gesteigerte Genexpression von c-fos und c-myc trotz der Anwesenheit von Genistein und NiCl_2 (des Ca^{2+} -Influx-Blockers) nicht geändert werden konnte, obwohl unter diesen Bedingungen die Ca^{2+} -Konzentrationssteigerung komplett blockiert wurde.

Auch für die Induktion von Egr-1 in humanen Osteoblasten (HOBIT) scheint eine Ca^{2+} -abhängige Signalübertragung keine entscheidende Bedeutung zu haben, denn obwohl nach einer Aktivierung der P2Y Purinrezeptoren durch extrazelluläres ATP

eine erhöhte Aktivität von PKC und ein Anstieg von intrazellulärem Ca^{2+} folgte, konnte eine Blockade des intrazellulären Calciumanstiegs mit einem Calciumchelator bis-(*o*-aminophenoxy)-ethane-N,N,N',N'-tetra-acetic acid tetrakis-(acetoxymethyl ester) (BABTA-AM) den stimulierenden Effekt von extrazellulärem ATP auf die Egr-1-Induktion nicht ändern (Pines et al. , 2003). Wie die Autoren zeigten, resultierte die mit extrazellulärem ATP induzierte Egr-1-Expression aus der Aktivierung von einer Ca^{2+} -unabhängigen PKC.

Park et al. (2004) berichteten, dass MPA die PDGF-induzierte Proliferation der vaskulären Muskelzellen partiell über die Hemmung der zellulären ROS und der ERK1/2 und p38 MAPK-Signalwege inhibieren konnte. Da dieser hemmende Effekt von MPA durch exogenes Guanosin nur teilweise antagonisiert werden konnte, wurde damit bewiesen, dass MPA zusätzlich zu IMPDH-Hemmung über die Modifikation der zellulären ERK1/2 und p38 MAPK-Signalwege antiproliferativ wirken kann. So könnten auch die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse dafür sprechen, dass MPA wahrscheinlich zusätzlich zu der IMPDH-Hemmung über die Inhibierung der durch PDGF-BB-aktivierten Signalwege: ROS und ERK1/2- und p38 Signalwege zu der Expressionshemmung von c-fos und Egr-1 führt und seine antiproliferative Wirkung an MZ ausüben kann. Einen eindeutigen Beweis, ob der suppressiver Effekt von MPA ein zusätzlicher Effekt der IMPDH-Inhibierung oder des darauf folgenden Guanosinnukleotid-Pool-Abfalls ist, könnte vielleicht die MPA-Behandlung der genetisch veränderten MZ ohne IMPDH-Gen liefern.

5.1.3 Mögliche Bedeutung der Ergebnisse für die klinische Anwendung von MMF

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erlangen eine Bedeutung für die klinische Anwendung von MMF an Patienten mit mesangioproliferativer GN. MPA, der aktiver Metabolit von MMF erwies sich als wirksamer Inhibitor der mit FCS-ausgelösten Proliferation von Mesangiumzellen in therapeutisch relevanten Konzentrationen. Dabei war die antiproliferative Wirkung dieses Immunsuppressivums nicht auf die Toxizität zurückzuführen. Darüber hinaus zeigte MPA eine hemmende Wirkung auf die durch PDGF-BB induzierte mRNA-Expression von PDGF-B und c-fos und Egr-1.

Eine inhibierende Wirkung von MPA auf PDGF-B konnte auch auf der Proteinebene nachgewiesen werden.

Die *in vitro* erzielten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich auch auf *die in vivo* durchgeführten Experimente anderer Forscher übertragen. Wie eine Studie von Ziswiler et al. (1998) zeigte, konnte MPA sowohl *in vitro* als auch *in vivo* effektiv die Proliferation der Mesangiumzellen hemmen. Eine Therapie von Nephritis-Ratten mit MMF führte zu einer signifikanten Reduktion der Proteinurie sowie zu einer signifikanten Verbesserung der glomerulären Histologie, bestimmt anhand der glomerulären Zellularität, der Synthese von *alpha-smooth muscle actin* (SMA), der extrazellulären Matrixdeposition und der glomerulären Hypertrophie.

Inzwischen ergaben auch viele klinische Studien, dass die Behandlung von Patienten mit MMF nach einer Organtransplantation die renale Funktion verbessern kann (Baryalei et al., 2003; Pfizmann et al., 2003; Ziolkowski et al., 2003). Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass MPA in therapeutischen Dosierungen in der Lage ist, die Proliferation von Mesangiumzellen effektiv zu verhindern. Dieser supprimierender Effekt von MPA, könnte teilweise ein Resultat der Hemmung der autokrinen PDGF-BB Synthese sein, die aufgrund der reduzierten c-fos und/oder Egr1 Expression vorkommen könnte. Die therapeutisch nutzbare antiproliferative Wirkung von MPA kann also möglicherweise diese Effekte beinhalten, die wahrscheinlich zusätzlich zu der IMPDH-Inhibierung zu der Proliferationshemmung der MZ beitragen. Hierzu sind selbstverständlich noch weitere Untersuchungen erforderlich.

5.2 Proliferationsuntersuchung von MZ unter dem Einfluss von Ramiprilat und Valsartan.

5.2.1 Angiotensin II- Wirkung an Mesangiumzellen

Untersuchungen der letzten Jahre belegen, dass die Wirkung des vasokonstriktorisches Peptidhormons Angiotensin II (Ang II) an der Niere über hämodynamische Regulationsvorgänge hinausgehen und wichtig für die Entstehung und das Fortschreiten von Nierenerkrankungen ist (Ichikawa & Harris, 1991; Wolf & Neilson, 1993, 1994). Ergebnisse mehrerer Studien erbrachten, dass Ang II eine

Hyperplasie (Vergrößerung eines Gewebes oder Organs durch einen Anstieg der Zellzahl) von vaskulären glatten Muskelzellen, Fibroblasten und renalen distalen Tubuluszellen, sowie eine Hypertrophie (Vergrößerung eines Gewebes oder Organs durch eine Zunahme der Zellgröße mit einem Protein-Anstieg ohne Zellzahlzunahme) in glatten Muskelzellen, Myozyten und renalen proximalen Tubuluszellen bewirkt (Itoh et al., 1993; Gibbons et al., 1992; Koibuchi et al., 1993; Schorb et al., 1993; McKay et al., 1998; Iwami et al., 1996; Wolf und Ziyadeh, 1997). In der Literatur gibt es keine einheitlichen Befunde zum Wachstumsverhalten von Mesangiumzellen nach Stimulation mit Ang II. Ergebnisse mehrerer Arbeitsgruppen weisen auf eine hypertrophieauslösende Wirkung von Angiotensin II auf die Mesangiumzellen hin (Ganz et al., 1990; Huwiler et al., 1995; Schulze et al., 1993). Diese Arbeitsgruppen stellten keine Änderungen des H^3 -Thymidin-Einbaus bis 72 h nach Ang II-Stimulierung fest. Dafür wurde ein erhöhter Proteingehalt der mit Ang II stimulierten Zellen gemessen, was für eine hypertrophe Wirkung des vasoaktiven Proteins spricht (Huwiler et al., 1995). Demgegenüber sahen Wolf et al. (1992) Angiotensin II als ein proliferationsstimulierendes Peptid für Mesangiumzellen an, wobei hier Ang II ähnlich wie unter Bedingungen mit speziell hohem Glukosegehalt im Medium ein „zweizeitiges Wachstumsverhalten“ an Mesangiumzellen (Wolf, 2000) auslöst. In der ersten Phase nach einer Stimulation mit Ang II (bis 48 h) werden die Zellen zur Proliferation angeregt, dabei wird eine verstärkte DNA-Synthese beobachtet. Danach folgt die Phase 2 (nach 72 h), in der die Zellen in der G1-Phase aufgehalten werden und eine Zellvolumenzunahme stattfindet (Wolf et al., 1992; Young et al., 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Proliferation der Mesangiumzellen unter dem Einfluss von Angiotensin II und nach Behandlung mit Valsartan (ein AT1-Rezeptorblocker) oder Ramiprilat (ein ACE-Hemmer) über eine längere Inkubationszeit (bis 7 Tage) beobachtet. Die Analyse der DNA-Synthese zeigte eine signifikante Erhöhung des BrdU-Einbaus in die DNA der mit Ang II inkubierten Zellen nach 5 Tagen nach der Stimulation. Die durch Ang II induzierte Erhöhung des BrdU-Einbaus war statistisch signifikant, aber im Vergleich zu der Zunahme der Proteinmenge der Zellen, gemessen nach 4 Tagen, nur gering (118% im Vergleich zu der unstimulierten Kontrolle). Der Proteingehalt pro Zelle wurde unter dem

Einfluss von Ang II verdoppelt, gleichzeitig aber wurde eine Zellzahlreduktion festgestellt. Diese Ergebnisse deuten auf die Entwicklung einer Zellhypertrophie hin. 7 Tage nach Stimulation wurde die durch Ang II-induzierte zelluläre Hypertrophie noch stärker (4-fach im Vergleich zu unstimulierten Kontrolle).

Den Grund für die Proliferationshemmung unter dem Einfluss von Ang II sieht Wolf et. al (1992) in der verstärkten autokrinen Synthese von TGF- β . Eine Abnahme einer durch hohe Glukose-Spiegel ausgelösten Zellhypertrophie konnte durch Zugabe von Anti-TGF- β Antikörper erreicht werden (Wolf et al., 1992). Die durch Ang II verstärkte Synthese von TGF- β führt zu einer gesteigerten Expression von CDK-Inhibitoren wie p21 und p27 (Wolf et al., 2000, 2003). Als Folge wird der Transfer der Zellen von der G1-Phase zu der S-Phase blockiert, in diesem Fall werden die Zellen in der G1-Phase aufgehalten und entwickeln eine Hypertrophie (Shankland & Wolf, 2000; Wolf et al., 2000; Abb. 5-2).

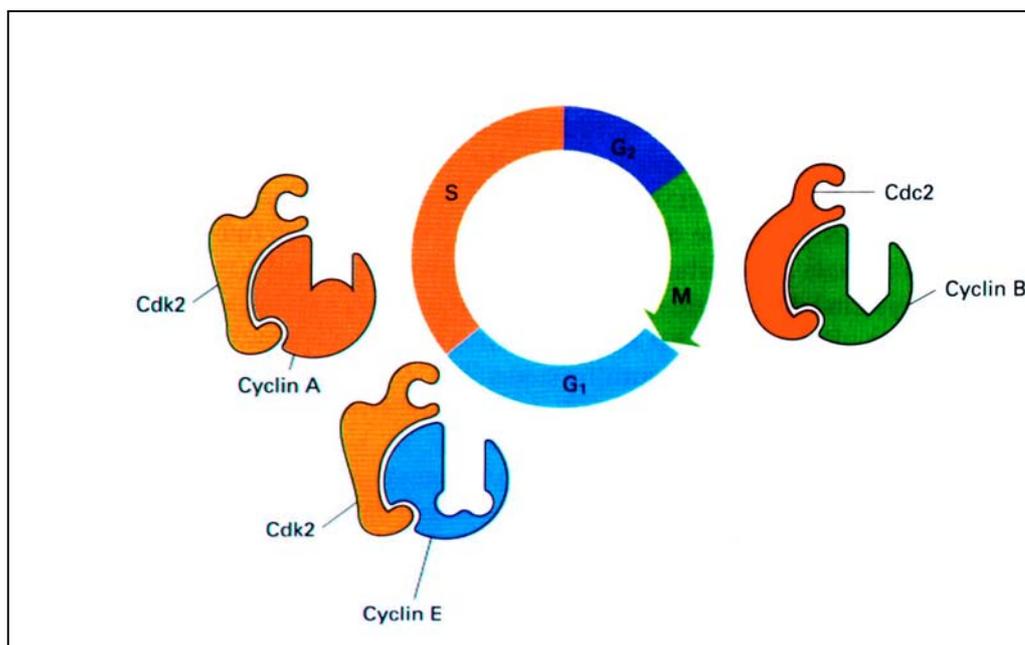


Abbildung 5-2: Zykline und CDK-Proteine im Zellzyklus (Alberts et al., 1995).

Des Weiteren führt eine durch Ang II erhöhte Synthese von TGF- β zu einer verstärkten Produktion von Matrixproteinen und vielen Berichten zufolge trägt dies zur Entwicklung der Zellhypertrophie bei (Kagami et al., 1994; Leehey et al., 2000; Wolf et. al., 1993, 1995b). Diese Hypothese unterstützen auch Eng et al. (1994), die

annehmen, dass die extrazelluläre Matrixakkumulation nach einer initialen Proliferation von Mesangiumzellen zu einer Inhibierung der Zellproliferation führen kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde parallel zu der signifikanten Hypertrophie unter dem Einfluss von Ang II auch eine gering aber signifikant erhöhte BrdU-Einbaurate bei einer gleichzeitigen Zellzahlreduktion nachgewiesen. Unter Berücksichtigung der Zellzahlabnahme müsste also das Verhältnis DNA/Zellzahl der mit Ang II stimulierten Zellen deutlich höher gewesen sein.

Eine erhöhte DNA-Synthese kann in manchen Fällen nicht mit der Proliferation gleichgesetzt werden, sondern kann ein Ausdruck einer Endoreduplikation sein. Endoreduplikation stellt ein Prozess da, bei dem der Kern nach einer S-Phase der DNA-Replikation keine Mitose durchläuft. Als Folge weisen solche Zellen einen erhöhten DNA Gehalt auf (Sugimoto-Shirasu et al., 2002). Eine Zellhypertrophie mit einer Polyploidie (Zellen enthalten mehr als zwei Sätze homologer Chromosomen) wurde in glatten Muskelzellen der Arterie bei hypertensiven Ratten festgestellt (Black et al., 1989; Leitschuh & Chobanian, 1987; Owens, 1985). Neuere Untersuchungen ergaben, dass die Endoreduplikation durch eine Dysregulation der CDKs verursacht wird. Die Inhibition der die S Phase-fördernden Zyklin A-CDK sowie die Inaktivierung des Mitosefaktors Zyklin B-CDK1 erfolgt durch eine Induktion von CDK Inhibitor p27 und p53-abhängige Induktion des CDK-Inhibitors p21 (Gabor, 2000, Niculescu et al., 1998; Chibazakura et al., 2004; Bates et al., 1998; Gottifredi et al., 2004). Ergebnisse neuester Untersuchungen weisen darauf hin, dass der CDK-Inhibitor p21 den Zellzyklus auch in der G2- und M-Phase inhibieren kann (Chang et al., 2000; Shankland & Wolf, 2000). Somit könnten die Zellen eine Zellhypertrophie mit einer Zunahme an DNA ohne Zellteilung (Endoreduplikation) entwickeln. Darüber hinaus wurde bewiesen, dass der CDK Inhibitor p27^{kip1} die Zellen vor Apoptose schützt (Ophascharoensuk et al., 1998). Dies könnte auch erklären, dass in der vorliegenden Arbeit unter Ang II in dem untersuchten Konzentrationsbereich (von 0,1 µM bis 10 µM) keine Toxizität auftrat.

Die durch Ang II vermittelte Zellhypertrophie mit der Endoreduplikation, worauf die in der vorliegenden Arbeit erzielten Befunde hindeuten, hat wahrscheinlich entscheidende Bedeutung für die Pathogenese der Glomerulosklerose und der

interstitiellen Fibrose, welche im Rahmen von chronischen Nierenerkrankungen beobachtet werden. Darüber hinaus gibt es in der Literatur Hinweise, dass Ang II in der Lage ist, verschiedene intra- und extrazelluläre Proteasen zu hemmen (Ling et al., 1995). Dieser Effekt kann zusätzlich zur stimulierten Proteinsynthese für die Entwicklung der Zellhypertrophie durch eine Hemmung des Proteinabbaus wichtig sein.

5.2.2 Einfluss des AT1-Antagonisten Valsartan auf die durch Ang II vermittelten zellulären Effekte in Mesangiumzellen

Unter Berücksichtigung der Hinweise auf das Vorhandensein des lokalen gewebständigen intrarenalen Renin-Angiotensin-Systems (RAS) (Braam & Koomans, 1996; Atiyeh et al, 1995; Becker et al., 1998) wurde der ACE-Hemmer Ramiprilat in der vorliegenden Arbeit trotz der externen Ang II-Simulierung auf seine Wirksamkeit untersucht. Jedoch konnten keine Effekte von Ramiprilat in den durchgeführten Versuchen festgestellt werden. Offenbar war kein lokales RAS in den untersuchten MZ vorhanden. Experimentelle Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen weisen darauf hin, dass obwohl ACE-Hemmer die Ang II-Produktion in der Zirkulation signifikant hemmen, kann die Bildung von gewebständigem Ang II durch diese Pharmaka nur inkomplett inhibiert werden (van Kats et al., 1998; Campbell et al., 1994). Dies kann auch daran liegen, wie im Herz oder in Blutgefäßen nachgewiesen wurde, dass die Bildung von Ang II aus Ang I nicht nur durch ACE katalysiert wird, sondern auch durch andere gewebständige Enzyme wie die H-Chymase oder die Bildung von Ang II auch direkt aus Angiotensinogen durch die Wirkung solche Enzyme wie das Kathepsin, Tonin oder Chymotrypsin möglich ist (Urata et al., 1993; 1995).

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine Behandlung der Mesangiumzellen mit dem AT1-Antagonist Valsartan in einer Hemmung des unter Ang II erhöhten BrdU-Einbaus und der durch dieses Peptidhormon ausgelösten Hypertrophie resultierte. Diese Ergebnisse sprechen für einen renoprotektiven Effekt von Valsartan, der über den AT1-Rezeptor vermittelt wird. Auch der Befund, dass Valsartan nur eine Wirksamkeit auf die mit Ang II stimulierten Zellen und nicht auf die durch FCS (oder PDGF-BB) ausgelöste Zellproliferation zeigte, ist ein weiterer

Beweis für einen via AT1 vermittelten spezifischen Wirkungsmechanismus von Valsartan. Auch in Versuchen von Mueck et al. (1999) an glatten Muskelzellen erwies sich Valsartan als ein effektiver Inhibitor nur von der durch Ang II-induzierten Proliferation. Welche intrazelluläre Vorgänge durch die Blockierung des AT1-Rezeptors unter Valsartan beeinflusst werden und welche Rolle dabei der AT2-Rezeptor für das Wachstumsverhalten spielt, könnte ein Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Auf Grund der Blockade des AT1-Rezeptors wird mehr Ang II gebildet, welches dann intensiver am nicht blockierten AT2-Rezeptor wirksam sein kann (Unger et al., 1996; Chung & Unger, 1999). Mehreren Untersuchungen zufolge sollen die wachstumshemmenden Effekte von Ang II über den AT2-Rezeptor vermittelt werden (Nakajima et al., 1995; Stoll et al., 1995; Unger et al., 1996; Wolf et al., 2004), während über den dominierenden AT1-Rezeptor eine verstärkte Zellproliferation oder Hypertrophie hervorgerufen wird (Wolf et al., 1994). Der AT-2 Rezeptor soll als Gegenspieler des AT-1 Rezeptors wirken und kann in Zellen Apoptose auslösen (Berk, 2001; Horiuchi et al., 1997, 1998; Yamada et al., 1996, 1998). Untersuchungen von Goto et al., (1997) ergaben, dass die Expression des AT2-Rezeptors in Mesangiumzellen der normotensiven Raten wachstumsabhängig ist und der AT2-Rezeptor eine regulatorische inhibitorische Funktion auf die Proliferation und das Wachstum der Zellen ausübt. Eine verminderte Expression des AT2-Rezeptors wurde demgegenüber an Zellen von hypertensiven Raten festgestellt, und dies ist wahrscheinlich für eine erhöhte Proliferationsaktivität der Zellen und möglicherweise für die daraus folgende renale Funktionsstörung verantwortlich.

In der vorliegenden Arbeit wurde unter Ang II-Stimulation eine Zellzahlabnahme festgestellt, die aber nicht auf eine toxische Wirkung dieser vasoaktiven Peptids zurückzuführen ist. Weder unter Ang II noch unter Ang II plus Valsartan wurde eine Toxizität im LDH-Test festgestellt. Durch die Blockade des AT1 Rezeptors mit Valsartan konnte die Zellzahlabnahme unter 0,1 μM Ang II-Stimulation signifikant ($p \leq 0,01$) und vollständig aufgehoben werden. Mit steigenden Konzentrationen von Ang II nahm jedoch der gegen Ang II-wirkende Effekt von Valsartan ab. Diese Ergebnisse sprechen daher für einen „anti-proliferativen“ Effekt des AT2-Rezeptors.

Beweise für eine durch den AT₂-Rezeptor vermittelte antiproliferative Wirkung von Ang II, wurden u. a. in Experimenten von Wolf et al., (2004) erbracht. Hierbei wurde festgestellt, dass die Anbindung von Ang II an den AT₂ Rezeptor eine Unterregulation der mRNA-Expression von SM-20 bewirkt, wodurch es wahrscheinlich zu einer verstärkten Expression von *hypoxia inducible factor alpha* (HIF- α) kommt (Wolf et al., 2004).

SM-20 ist ein „*early response gen*“, das ursprünglich aus den glatten Muskelzellen (*smooth muscle cell* - SMC) der Aorte der Ratte kloniert wurde, und das für ein 40-kD zytoplasmatisches Protein kodiert. Dieses intrazelluläres Protein gehört zu der Familie der Prolyhydroxylasen, die für die post-translationale Modifikation von HIF-1 α zuständig sind (Wax et al., 1996; Moschella et al., 1999; Menzies et al., 2004; Freeman et al., 2003). Diese Enzyme katalysieren die Hydroxylation an Prolin, was eine Voraussetzung für die Bindung des *von Hippel-Lindau tumor suppressor proteins* (pVHL) an die *oxygen-dependent degradation domain* (ODD) des HIF-1 α und für die weitere Ubiquitinierung ist. Auf diese Weise wird der HIF-1 α für die proteasomale Degradation bei normoxischen Bedingungen markiert (Huang et al., 1998; Zagorska & Dulak, 2004; Abb. 5-2). Unter hypoxischen Bedingungen, aber auch unter dem Einfluss von Stimuli (NO, Wachstumsfaktoren, Inhibitoren von Prolyl- und Asparaginy-Hydroxylasen) wird HIF-1 α stärker induziert, kann wegen der inaktiven HIF-1-Prolyl-Hydroxylasen nicht ubiquitiniert werden und entgeht auf diese Weise dem proteasomalen Proteinabbau. Stattdessen aber wird HIF-1 α in den Nukleus transportiert und nach der Dimerisierung mit HIF-1 β zusammen den Transkriptionsfaktor HIV-1 bildet (Zagorska & Dulak 2004; Huang & Bunn, 2003).

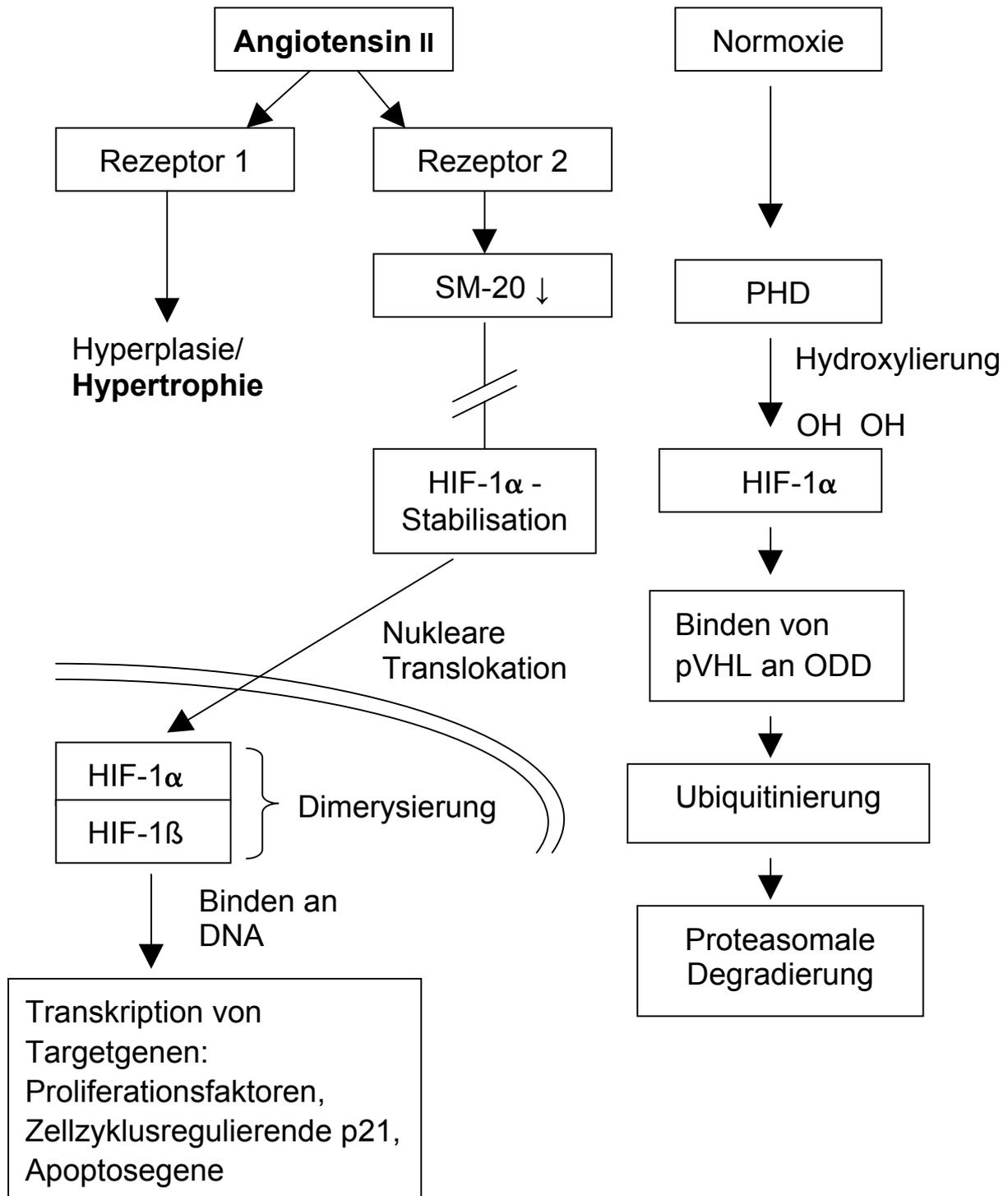


Abbildung 5-3: Regulation von HIF-1α. **Rechts:** Unter normoxischen Bedingungen findet kontinuierlich eine Degradation von HIF-1α durch ein 26S Proteasom statt. PHD: Prolylhydroxylase; pVHL: „von Hippel-Lindau tumor suppressor protein“; ODD: „oxygen-dependent degradation domain“. **Links:** Unter Ang II-Stimulierung (oder hypoxischen Bedingungen) wird HIF-1α stabilisiert und transkriptionell aktiv.

HIF-1 kann die Expression vieler Gene regulieren, deren Produkte nicht nur bei anaeroben Energiegewinnung aber auch u. a. bei der Proliferation, Regulation des Zellzyklus und Apoptose (Feldser et al., 1999; Galvin et al., 2004; Li et al., 2004; Carmeliet et al., 1998; Bruick, 2000) eine wichtige Rolle spielen (Abb. 5-3).

Dem Bericht von Richard et al. (2000) zufolge ist die hypoxisch-unabhängige Induktion von HIF-1 α via Angiotensin II ein Resultat der Aktivierung von zwei separaten Signalwegen: Erstens findet eine stärkere PKC-abhängige Gentranskription von HIF-1 α statt. Dann folgt unter dem Einfluss von Ang II eine Intensivierung der Translation von HIF-1 α , was durch eine von den *reactive oxygen species* (ROS)-abhängige Aktivierung der PI3K-Signalwegen vermittelt wird (Page et al., 2002). Es ist also nicht auszuschließen, dass die in der vorliegenden Arbeit beobachteten antiproliferativen Effekte unter Ang II an Mesangiumzellen aufgrund der Unterregulierung von SM-20 und der daraus resultierenden verstärkten HIF-1 α Expression auftraten. Um diesen Wirkmechanismus bestätigen zu können, und zur Klärung der Frage, ob für die Zellzahlabnahme möglicherweise Apoptose verantwortlich ist, sind weitere gezielte Untersuchungen erforderlich.

Es wurde gezeigt, dass ein anderer AT1-Rezeptorblocker Losartan die durch Ang II induzierte Tyrosin-Phosphorylierung der PLC bei proximalen epithelialen Tubuluszellen blockierte (Lea et al., 2002). So wird die Synthese von Inositoltriphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) gehemmt. Als Folge wird die intrazelluläre Kalzium-Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) vermindert. Auf diese Weise kommt es zur Hemmung von kalziumabhängigen Prozessen wie der Kontraktion der glatten Muskelzellen, der Aldosteronproduktion und der Katecholamin-Freisetzung sowie zu einer Hemmung der Aktivierung verschiedener kalziumabhängigen Enzyme wie Calcineurin (Lea et al., 2002) oder verschiedener Proteinkinasen (Inagaki et al., 2002; Muscella et al., 2003; Chen et al., 2002). Somit können die AT1-Rezeptorantagonisten die Überführung inaktiver Proteinkinasen in aktive reduzieren und eine Proliferationshemmung bei Zellen bewirken (Greco et al., 2002; 2003; Imanishi 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurde unter Ang II parallel zu der erhöhten DNA-Synthese ein signifikant erhöhter *mRNA steady state level* von Egr-1 gemessen. Egr-1 ist ein Mitglied der Genfamilie der so genannten *immediate-early-gene* (IEG) und wird nach

einer mitogenen Stimulierung rasch und transient induziert (Rupprecht et al., 1992a, 1993). Es wurde in vielen Berichten gezeigt, dass Angiotensin II eine Induktion von Egr-1 bewirkt (Fu et al., 2002; McKay et al., 1998; Iwami et al., 1996; Rupprecht et al., 1992b). Viele Wissenschaftler konnten auch beweisen, dass Egr-1 als Transkriptionsfaktor mehrerer Gene fungiert (Gupta et al., 1991; Kinane et al., 1994; Lemaire et al., 1990; Molnar et al., 1994; siehe Abschnitt 1.3, Seite 19). Mit Hilfe der Antisense-Oligonukleotid-Strategie zeigten Rupprecht et al. (1997), dass die Egr-1-Induktion einen essenziellen Bestandteil der mitogenen Signaltransduktionskaskade in kultivierten Mesangiumzellen darstellt.

Der Induktion von Egr-1 Expression kann nicht immer eine Zellproliferation folgen, mehrere Studien belegten, dass ein Zusammenhang zwischen einer Induktion von Egr-1 und der Anti-Proliferation bis zur Apoptose besteht (Liu et al., 1998; Lee et al., 2004). Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten jedoch darauf hin, dass die Zellen in der G1/S-Phase aufgehalten wurden, da unter Ang II-Stimulierung eine signifikante Induktion von Egr-1-mRNA und eine erhöhte DNA-Synthese und Zellhypertrophie nachgewiesen wurde. Nur ein Verlassen des Zellzyklus am „G1-Exit“ geht mit Apoptose einher (Shankland & Wolf, 2000). Experimente von McKay et al. (1998) an glatten Muskelzellen der Atemwege zeigten, dass unter Angiotensin II parallel zu der signifikant erhöhten DNA- und Proteinsynthese ohne eine Zellzahlzunahme und der induzierten Expression der Transkriptionsfaktoren Egr-1 und c-fos auch TGF- β 1 hochreguliert wurde. Aus diesen Ergebnissen wurde gefolgert, dass die durch Ang II-induzierte Expression von IEG (Egr-1 und c-fos) die autokrine Synthese von TGF- β 1 regulieren kann, der vielen Befunden zufolge als antimitogener Faktor letztendlich zur Entwicklung der Zellhypertrophie beiträgt. Diese Befunde lassen vermuten, dass möglicherweise die in der vorliegenden Arbeit observierte antiproliferative Wirkung von Ang II zumindest partiell auf die induzierte Egr-1-Expression und die daraus resultierende autokrine TGF- β -Synthese zurückzuführen wäre. Diese Hypothese kann durch Ergebnisse von Liu et al. (1996) unterstützt werden, die ergaben, dass der suppressive Effekt von Egr-1 auf die Zellproliferation über die Induktion von TGF- β 1 vermittelt wird. Inzwischen ist auch bekannt, dass die Promotorregion von TGF- β 1 zwei GC-reiche Bindungsseiten für Egr-1 aufweist (Kim et al., 1994; Liu et al., 1996). Letztendlich bewirkt TGF- β über einen autokrinen Mechanismus, in den

PKC-MAPK and JNK Signalwege involviert sind, eine verstärkte Produktion von extrazellulären Matrixproteinen (ECM) (Toyoda et al., 2004; Ventura et al., 2004). Zum Beispiel präsentierten Iwami et al. (1996), dass Ang II in Herzfibroblasten sowohl die Egr-1-Expression induziert als auch eine erhöhte mRNA-Expression von Fibronectin auslöst. Wie diese Autoren auch zeigten, wurden die durch Ang II ausgelösten Effekte hauptsächlich durch AT1-Rezeptor vermittelt, denn eine Blockade des AT1-Rezeptors mit Losartan führte zu einer Inhibierung dieser Effekte. Molnar et al. (1994) schrieben Egr-1 eine bedeutende Rolle in der Regulation der Expression von Thymidinkinase (TK)-Gen während des Transits von G0 zu G1 zu. Darüber hinaus präsentierten Guillemot et al. (2001) das Protein Egr-1 als einen Vermittler in der durch Ang II-induzierten Aktivierung der Transkription von Zyklin D1. Nach Angaben dieser Autoren wird die Ang II-induzierte Zyklin D-Hochregulierung via eine Aktivierung und eine spezifische Interaktion von Egr-1 mit einer bestimmten Promotorregion von Zyklin D vermittelt, wobei p21(ras)/ Raf1/MEK/ERK, PI3K und SHP-2- Signaltransduktionswege involviert sind.

Zyklin D –Konzentrationen steigen nach einer mitogenen Stimulation während des Übergangs von G0 zu G1 (Baldin et al., 1993) und bilden zusammen mit Zyklin-abhängigen Kinasen (CDK) 4 und 6 aktive Zyklin D-CDK Komplexe (Sherr, 1994, 1995). Diese führen eine Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins (pRb) in der G0 und in der früheren G1-Phase durch, auf diese Weise wird die Repression von Zielgenen des pRb-Signalwegs wie Zyklin E beendet. Dabei ist pRb nur hypophosphoryliert und blockiert in diesem aktiven Zustand den Transkriptionsfaktor E2F (Buchkovich et al., 1989; Ewen et al., 1993; Riley et al., 1994; Weinberg et al., 1995). In Folge einer weiteren Phosphorylierung durch aktive Zyklin E-CDK Komplexe wird pRb hyperphosphoryliert, und somit inaktiviert. Dies bewirkt die Freisetzung und Aktivierung des E2F-Transkriptionsfaktors, der die Expression vieler Targetgene, die für das Fortschreiten des Zellzyklus wichtig sind, einschließlich IEG, TK, reguliert (Shankland & Wolf, 2000). Den Befunden von Helt et al., (2002) zufolge trägt die Inaktivierung der beiden Proteine p21 und pRb zur Inhibition des G1-Arrests bei, eine Inaktivierung von einem der beiden Faktoren alleine scheint insuffizient zu sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass eine ansteigende Konzentrationsabhängige Expression von Egr-1 auf mRNA Ebene nach Ang II-Stimulierung auftrat, die mit einer signifikanten Zunahme der DNA-Synthese ohne Zellteilung korrelierte. Wahrscheinlich führte die durch Ang II stimulierte Egr-1 Induktion einerseits zu Aktivierung der TK-Gene, deren Produkt das Enzym TK an der DNA-Synthese beteiligt ist, andererseits zu der Hochregulierung der Zyklinen D, die im Komplex Zyklin D-CDK das pRb nur hypophosphorylieren. Des Weiteren führte die vermehrte Synthese von TGF- β zu einer verstärkten Expression der CDK-Inhibitoren p21 und p27. Wegen der Blockade der Zykline E-CDK durch p21 und p27 war vermutlich die weitere Phosphorylierung des pRb nicht möglich und der Transkriptionsfaktor E2F blieb inaktiv. Es ist also anzunehmen, dass aufgrund einer Aktivierung der Egr-1-abhängigen Signalwege und der Inaktivierung des Transkriptionsfaktors E2F unter der Ang II Wirkung sich die Zellhypertrophie parallel zur Endoreduplikation entwickeln kann (Abb. 5-4).

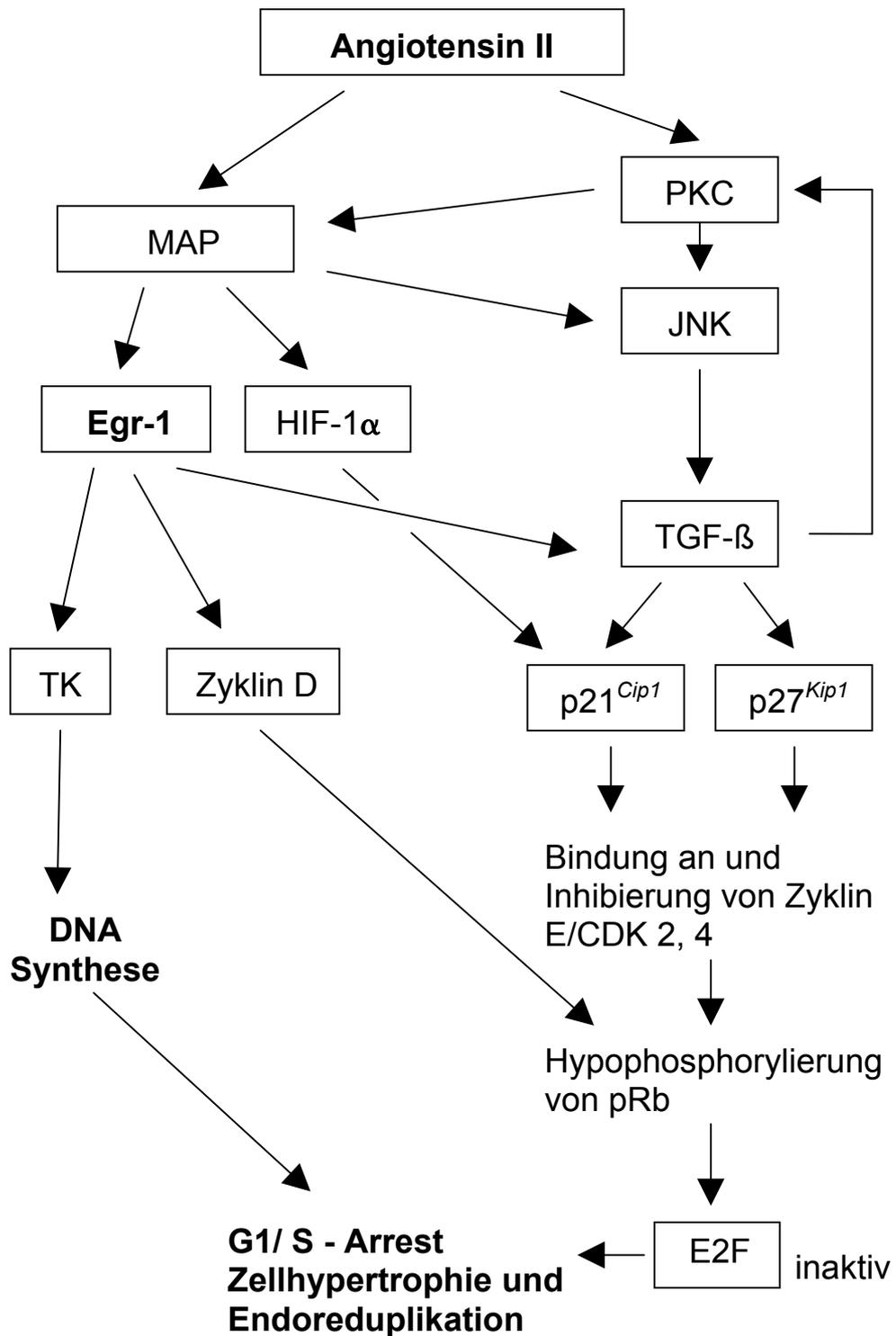


Abbildung 5-4: Entwicklung einer Zellhypertrophie mit Endoreduplikation unter dem Einfluss von Angiotensin II bei Mesangiumzellen. MAPK: mitogenaktivierte Protein- Kinase, Egr-1: early-growth-response-gen-1, HIF-1α: hypoxia inducible factor α, TK: Thymidinkinase, PKC: Proteinkinase C, JNK: cJun N-terminal-Kinase, TGF-β: transforming growth factor β, CDK: cyclin-dependent-kinase, pRb: Retinoblastoma-Protein.

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen nach, dass durch eine Behandlung der Zellen mit dem AT1-Blocker Valsartan eine signifikante Reduktion der unter Ang II induzierten Egr-1-mRNA-Expression und der erhöhten DNA-Synthese und Zellhypertrophie erreicht wurde. Hingegen konnten keine Änderungen dieser durch Ang II ausgelösten Effekte unter dem ACE-Hemmer Ramiprilat festgestellt werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Ang II-Effekte Zellhypertrophie und Endoreduplikation hauptsächlich via AT1 vermittelt wurden. Valsartan als der AT1-Antagonist konnte teilweise über die Reduktion der Egr1 Expression und der daraus folgenden Modifikation der Egr-1-abhängigen Signalwege die durch Ang II hervorgerufene Zellhypertrophie und Endoreduplikation inhibieren. Hierbei ist es nicht auszuschließen, dass die Hemmung der CDK-Inhibitoren p21^{Cip1} und p27^{Kip1}, und deren *up-stream* Signaltransduktionswege, die u. a. Egr-1 einschließen (oder andere Transkriptionsfaktoren wie HIF-1 α), eine entscheidende Rolle spielt. Dem Bericht von Mei et al. (2001) zufolge, wurde eine verminderte Expression von p27^{Kip1} nach einer Blockade des AT1-Rezeptors mit Losartan beobachtet. Ob dieser Effekt auch für Valsartan gilt, sollte in weiteren Untersuchungen gezielt geprüft werden.

5.2.3 Bedeutung der Ergebnisse für die klinische Anwendung von Valsartan

Die Antagonisierung der Ang II-Effekte stellt eine Hauptsäule der Behandlung progressiver Nierenschäden dar. In vielen tierexperimentellen Modellen mit einer chronischen Niereninsuffizienz wurde gezeigt, dass eine Behandlung mit ACE-Hemmern oder AT1-Rezeptorblockern zu einer Hemmung des kompensatorischen Nierenwachstums und zu einer Verbesserung der Nierenfunktion führte. Auch klinische Studien belegen, dass die Entwicklung einer Niereninsuffizienz bei Patienten mit verschiedenen primären Nierenerkrankungen wie Glomerulopathien, interstitieller Nephritis und diabetischer Nephropathie durch die ACE-Hemmung verlangsamt werden konnte (Maschio et al., 1996). Die renoprotektive Wirkung der ACE-Hemmer und AT1-Antagonisten, wie in vielen klinischen Studien deutlich wurde (REIN Studie, REIN *follow up* Studie, AASK Studie, AIRE Studie, Micro-HOPE Studie, Plum et al., 1999), beruht nicht nur auf der Blockade der durch Ang II ausgelösten hämodynamischen Effekte, sondern auch auf der Hemmung der durch

Ang II verursachten Zellproliferation, extrazellulären Matrixsynthese und Förderung des Matrixabbaus.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Pharmaka Ramiprilat (ACE-Hemmer) und Valsartan (AT1-Antagonist) auf ihre molekulare Wirkung an Mesangiumzellen aus der Ratte getestet. Es wurde eine Monozellkultur verwendet, um den Einfluss der parakrinen Mechanismen zu vermeiden.

Ramiprilat als Repräsentant der ACE-Hemmer konnte keine Wirkung auf die durch Ang II hervorgerufene Effekte zeigen. Dieser Befund deutet auf ein fehlendes Vorhandensein des lokalen RAS oder auf ein durch externe Ang II-Stimulation nicht zu Geltung kommendes lokales RAS hin.

Demgegenüber konnte der AT1-Antagonist Valsartan alle negativen Auswirkungen von Ang II Egr-1-Genexpression, erhöhte DNA-Synthese (hier wahrscheinlich ein Ausdruck der Endoreduplikation) und Zellhypertrophie effektiv inhibieren. Dabei bleibt die Frage offen, ob diese Effekte nur auf der AT1-Blockierung beruhen, und ob der AT2 nach der AT1-Antagonisierung eine modulierende Funktion für die zelluläre Signaltransduktion ausübt. Um dies zu erklären, müssen noch weitere Studien folgen.

Zusammenfassend konnte der renoprotektive Wirkmechanismus des AT1-Antagonisten auf der molekularen Ebene in der vorliegenden Arbeit zumindest partiell geklärt werden. Der Erfolg von Valsartan besteht in der Hemmung der Zellhypertrophie und Endoreduplikation, weshalb die Mesangiumzellen vor der durch Ang II provozierten irreversiblen Hypertrophie und damit Insuffizienz geschützt werden. Somit erlangen die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse eine Bedeutung für den klinischen Einsatz von Valsartan an Patienten mit primären Nierenerkrankungen.

5.3 Antiproliferative Wirkung von Cerivastatin auf Mesangiumzellen.

Neuere Forschungsergebnisse der Behandlung von Nierenerkrankungen weisen darauf hin, dass Statine unabhängig von ihrer cholesterinsenkenden Wirkung einen renoprotektiven Effekt ausüben (Guijaro und Kaene, 1996; Buemi et al., 2000; Gheith et al., 2002; Lee et al., 2002). Hier werden zelluläre Mechanismen wie die antiproliferative Wirkung auf Mesangiumzellen im Rahmen der Glomerulonephritis diskutiert. Eine Simvastatinbehandlung der Ratten mit einer anti-Thy 1.1 Nephritis führte zu einer Suppression der mesangialen Zellproliferation und extrazellulären Matrixexpansion sowie einer Blockade von Makrophageninfiltration in die Glomeruli (Yoshimura et al., 1999). Eine Reduktion der extrazellulären Matrixakkumulation wurde unter Simvastatin auch *in vitro* bei Mesangiumzellen festgestellt (Nogaki et al., 1999). Eine Untersuchung von Grandaliano et al. (1993) wies darauf hin, dass Simvastatin die mit PDGF induzierte DNA-Synthese hemmte, ohne aber mit PLC oder PKC zu interferieren und ohne die Induktion von PDGF-B-mRNA zu beeinflussen.

Alle durchgeführten Proliferationsversuche der vorliegenden Arbeit wiesen nach, dass Cerivastatin analog zu Simvastatin signifikant und dosisabhängig die mit FCS, PDGF-BB (diese Ergebnisse werden nicht aufgezeigt) oder IL-1 β ausgelöste Proliferation der Mesangiumzellen inhibieren konnte. Bei mit IL-1 β stimulierten Zellen war die antiproliferative Wirkung von Cerivastatin bis zu einer Konzentration von 0,1 μ M offensichtlich nicht zytotoxisch. Diese Beobachtungen waren äußerst wichtig, da Cerivastatin vor ca. zwei Jahren wegen seines unspezifischen schädigenden Einflusses auf Muskelgewebe und Rhabdomyolyse, was dosisabhängig geschehen sollte, vom Markt zurückgenommen wurde. Zu Beginn unserer Untersuchung befand sich Cerivastatin noch im klinischen Einsatz.

Ziel dieses Teils der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, welche zugrundeliegende Mechanismen für die antiproliferative Wirkung von Cerivastatin in mit Zytokinen stimulierten Zellen verantwortlich sind. Hierbei diente die mit IL-1 β stimulierte Mesangiumzelle als ein zelluläres Modell für die glomeruläre Entzündungsreaktion, bei der es zu einer ungehemmten Proliferation des Mesangiums kommt, im Rahmen der Sauerstoffradikale eine wichtige Rolle spielen. Das Zytokin IL-1 β , welches als inflammatorischer Reiz für Zellen gilt, stimuliert in

Mesangiumzellen die NO-Produktion über die induzierbare NO-Synthase (Pfeilschifter & Schwarzenbach, 1990). Inzwischen ist NO als eins der wichtigsten Signal- und Effektormoleküle in Säugerzellen bekannt, dass eine Vielzahl von Prozessen auslöst oder reguliert. Einige Studien zeigten, dass hohe NO-Konzentrationen inhibierend auf die Proliferation der Mesangiumzellen wirken (Rupprecht et al., 2000; Hruby et Beck, 1997). Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wiesen nach, dass der antiproliferative Effekt von Cerivastatin auf mit IL-1 β stimulierten Mesangiumzellen signifikant durch eine vermehrte NO-Produktion und iNOS-Expression vermittelt wurde. Die mit IL-1 β angeregte NO-Bildung, iNOS-mRNA- und Proteinsynthese wurde durch Cerivastatin signifikant und dosisabhängig potenziert. In mit IL-1 β und Cerivastatin behandelten Zellen war die NO-Produktion um den Faktor 2 bis 3-mal höher, die iNOS-mRNA um den Faktor 6- bis 20-fach und die iNOS-Proteinexpression 2- bis 4-fach stärker als in mit IL-1 β stimulierten Zellen ohne Cerivastatin. Es konnte gezeigt werden, dass die NO-Synthase in mit IL-1 β und Cerivastatin (bis zu 0,1 μ M) behandelten Zellen nicht mit Zellyse verbunden war, sondern mit einer signifikant reduzierten DNA-Synthese korrelierte. Eine Koinkubation der Mesangiumzellen mit einem NOS-Inhibitor (L-NMMA und L-NIL) resultierte in einer signifikanten Reduktion der durch Cerivastatin verstärkten und mit IL-1 β induzierten iNOS Aktivität und in einer Aufhebung der proliferationshemmenden Wirkung von Cerivastatin, was wiederum durch einen Substratüberschuss von L-Arginin antagonisiert wurde. Parallel durchgeführte Untersuchungen der Proteinexpression von iNOS bei mit IL-1 β stimulierten und mit Cerivastatin behandelten Zellen erbrachten, dass diese ebenso durch eine Koinkubation mit dem NOS-Inhibitor L-NMMA aufgehoben wurde. Diese Befunde untermauern die These, dass Cerivastatin mit der NO-induzierten iNOS-Expression in mit Zytokinen stimulierten Zellen interferiert und über eine vermehrte NO-Bildung eine Wachstumshemmung der Mesangiumzellen bewirkt.

Auch Befunde anderer Arbeiten weisen auf eine modulierende Wirkung von Statinen auf die NO-Produktion hin. Die Statine Atorvastatin und Simvastatin präventierten die reduzierende Wirkung von oxidiertem *low density lipoprotein* (LDL) auf mRNA- und Protein- Expression der endothelialen NO-Synthase (Hernandez-Perera et al., 1998). Diese Statine zeigten per se keinen signifikanten Einfluss auf die Expression der

eNOS. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden keine Änderungen der iNOS – Aktivität und - Expression unter Cerivastatin alleine sichtbar. Daraus lässt sich schließen, dass Cerivastatin die mesangiale iNOS-Expression und -Aktivität abhängig von einer enzymatischen Voraktivierung, in unserem Fall von der Stimulation mit dem Zytokin IL-1 β beeinflussen kann (Mühl und Pfeilschifter, 1995).

Mehrere Wissenschaftler bewiesen, dass manche Metaboliten des Mevalonat-Stoffwechsels durch ihre Funktion in der Signalübertragung eine bedeutende Rolle für die Transformation und das Wachstum der Zellen spielen (Fairbanks et al., 1984; Schafer et al., 1989; Quesney-Huneus et al., 1979; Schnitzer-Polokoff et al., 1982; O'Donnel et al., 1993b). In Übereinstimmung mit dieser These wurde die potenzierende Wirkung von Cerivastatin auf die iNOS-Aktivität durch eine Zugabe von Mevalonat in der vorliegenden Arbeit revidiert. Eine Koinkubation mit Isoprenoid Geranylgeranyl-Pyrophosphat (GGPP) führte ebenso zur Antagonisierung des potenzierenden Effekts von Statinen auf Zytokin-induzierte NOS-Expression (Hausding et al., 2000). Diese Autoren konnten auch nachweisen, dass die Intensivierung der iNOS mRNA-Expression und NO-Produktion unter den Statinen ähnlich wie unter TcdB (*Clostridium difficile toxin B*), einem Rho-Inhibitor, infolge der Hemmung von G-Proteinen aus der Rho-Familie stattfand.

So stellt die Reduktion der Isoprenylierung der G-Proteine, wie Ras oder Rho einen möglichen Mechanismus dar, durch den Cerivastatin die iNOS- und COX-2-Expression modifizieren könnte (Degraeve et al., 2001; Hausding et al., 2000). Eine Inaktivierung von Rho-GTPasen durch Statine wurde bereits gezeigt (Stamatakis et al., 2002). Diese Isoprenylierung der intrazellulären Signaltransduktionsmoleküle wie der *small* G-Proteine (p21ras, Rho und Rac) ist notwendig, damit eine Anheftung an intrazelluläre Membranen ermöglicht wird (Casey, 1992; Sinensky et Lutz, 1992; Jackson et al., 1997; Massy et al., 1999). Dafür werden Isoprenylderivate des Mevalonat-Stoffwechsels Farnesyl-Pyrophosphat (FPP) und Geranylgeranyl-Pyrophosphat (GGPP) benötigt, die als Lipidanker für die G-Proteine dienen. Nachdem ein Wachstumsfaktor oder Zytokin an seinen Rezeptor gebunden hat, wird eine Aktivierung von Ras-Proteinen beobachtet. Die weitere Signalübertragung vom Ras zum Zellkern verläuft zum einen über Raf-MAPK-ERK-Kinase-Kaskade (Chang und Karin, 2001), zum anderen über die Phosphatidylinositol 3`-Kinase- Trans-

duktionswege (Cantley, 2002). Letztlich führt der Weg zur Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren u. a. von (AP-1, NFκB, Egr-1) und anschließend zur Zellproliferation oder Zelldifferenzierung. Unter Statinen kommt es zur Reduktion der Synthese von FPP und GGPP, was den intrazellulären Transport und die subzelluläre Lokalisation membranassoziierter Proteine beeinträchtigt.

Zahlreiche *in vitro*-Befunde deuten daraufhin, dass proliferations-suppressive Effekte der Statine auf diesem Mechanismus beruhen. So wurde gezeigt, dass eine reduzierte Produktion von FPP und GGPP nach Behandlung der Mesangiumzellen mit den Statinen Lovastatin oder Simvastatin in einer Blockade der durch p21ras vermittelten mitogenischen Signalübertragung resultierte (Guijaro et al., 1996; Ishikawa et al., 1995; O'Donnel et al., 1993; Bassa et al., 1999). Diesen Autoren gegenüber schließen Grandaliano et al. (1993) die antiproliferative Wirkung von Simvastatin über den Ras-vermittelten Signalweg aus, denn nach ihren Angaben konnte dieses Statin die mit PDGF-induzierte DNA-Synthese hemmen, ohne mit PLC oder PKC zu interferieren und ohne die Induktion von PDGF-B-mRNA zu beeinflussen.

In der Arbeit von Danesh et al. (2002) wurde präsentiert, dass Simvastatin die durch hohe Glukose (HG) stimulierte Proliferation der Mesangiumzellen revidieren konnte, indem das Statin die Isoprenylierung von Rho-GTPase präventierte, infolgedessen die Aktivität von Zyklin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK2 reduziert und die Expression von CDK-Inhibitor p21 verstärkt wurde.

Durch die Reduktion der Mevalonat- und GGPP-Synthese erhöhten Lovastatin und Mevastatin die Expression von COX-2 und die Synthese von Prostacyclinen (Degraeve et al., 2001). Während eine Behandlung der Zellen mit einem Rho-GTPase Inhibitor ähnlich wie mit Statinen zu einer Hochregulierung von COX-2 führte, fand unter einem Rho-GTPase Aktivator eine Blockierung der Interleukin-1α abhängigen COX-2 Induktion. Aus diesen Daten ließ sich folgern, dass Statine die COX-2 Expression analog wie die iNOS Expression über eine Inhibierung von Rho Proteinen modulieren können.

In letzten Jahren wurde auch bewiesen, dass die Isoprenylierung von RhoA und RhoB für die Degradation von p27^{Kip1}, einem Zyklin –abhängigen Kinase Inhibitor (CDK), und anschließend für den Übergang des Zellzyklus von der G1 zu der

S-Phase erforderlich ist (Hirai et al., 1997; Seasholtz et al., 2001; Welsh et al., 2001). So wurde beobachtet, dass das durch Lovastatin induzierte p27^{Kip1} zum Stillstand des Zellzyklus in der G-1 Phase brachte (Hengst et al., 1994, 1996). In einer anderen Studie von Oda et al. (1999) wurde demonstriert, dass die durch Lovastatin reduzierte DNA-Synthese mit der Induktion von p27^{Kip1} und einer Suppression der Expression von dem Zyklin D1 und E bei glatten Muskelzellen korrelierte.

Eine anderer möglicher Signalweg, der durch Statine moduliert werden könnte, stellt die Aktivierung des nuklearen Faktors κ B (NF κ B) dar. Jedoch wie Hattori et al. (2002) feststellten, obwohl unter Statinen eine leichte Modulierung der mit IL-1 β -induzierten Aktivierung von NF κ B stattfand, korrelierte diese Modulierung nicht mit dem Statineffekt auf die NO-Produktion.

NO kann unterschiedliche Signaltransduktionswege aktivieren, u. a. die Bildung von cGMP über die Aktivierung von löslicher Guanylat-Zyklase (*soluble Guanylate Cyclase*, sGC) (Denninger et Marletta, 1999) sowie die von Ras-Proteinen (Takai et al., 2001; Lander et al., 1995). Im Laufe dieser Signaltransduktionsprozesse werden verschiedene Kinasen aktiviert u. a. PI 3K, die die Phosphorylierung weiter auf membranassoziierte Kinasen, wie z. B. PDK1/2 (*3-phosphoinositide-dependent protein kinase*) und Akt/PKB (Akt/Proteinkinase B) überträgt (Cantley, 2002; Alessi et al., 1997). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte ein eventueller möglicher Wirkmechanismus von Cerivastatin über den PI 3K/Akt/PKB Signalweg überprüft werden. Es wurden aber keine Änderungen der Phosphorylierung von PKB bei mit Cerivastatin behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen festgestellt. Auch mit FCS ausgelöste Phosphorylierung der PKB konnte mit Cerivastatin nicht gehemmt werden. Darüber hinaus brachte eine Inkubation der Zellen mit LY 294002 (einem PI 3-Kinase Inhibitor) keine Änderungen der mit IL-1 β und Cerivastatin induzierten iNOS-Expression (diese Ergebnisse wurden nicht aufgezeigt). Diese Befunde sprechen also gegen eine Vermittlung von Akt/PKB in der durch Cerivastatin evozierten Signaltransduktionswegen in Mesangiumzellen.

Die Untersuchung der Proteinexpression von COX-2 nach einer Stimulation mit IL-1 β in der vorliegenden Arbeit ergab, dass diese NO-abhängig ist und durch Zugabe des NOS-Inhibitors reduziert werden konnte. Unter Cerivastatin wurde die IL-1 β induzierte COX-2-Proteinexpression signifikant hochreguliert. Interessanter-

weise konnte die potenzierende Wirkung von Cerivastatin auf die mit IL-1 β induzierte COX-2-Proteinexpression durch den NOS-Inhibitor L-NMMA nur schwach, jedoch statistisch nicht signifikant aufgehoben werden. Aus diesen Daten ließ sich folgern, dass Cerivastatin die COX-2 Induktion wahrscheinlich nicht nur durch IL-1 β /NO vermittelte Signalwege verstärken kann.

Die COX-2 ist ein Schlüsselenzym in der Prostaglandinsynthese und gilt als eine induzierbare Form, die unter normalen Bedingungen in den meisten Geweben nicht, oder nur in einem geringen Maße exprimiert wird. In Mesangiumzellen kann die Expression von der COX-2 durch verschiedene Stimuli wie IL-1 β (Martin et al., 1994; Rzymkiewicz et al., 1994), Serotonin (Stroebel & Goppelt-Struebe, 1994), Lipopolysaccharide (LPS) (Yang et al., 1999), PDGF (Goppelt-Struebe et al., 2000) und Endothelin (Hughes et al., 1995; Sugimoto et al., 2001) stark induziert werden. Es wurde berichtet, dass die COX-2-Aktivität die proliferative Antwort glatter Muskelzellen auf eine Stimulation mit IL-1 β vermindern kann (Libby et al., 1988). Weiterhin wurde eine Expression der COX-2 mit einer gesteigerten Produktion von Prostacyclinen in atherosklerotischen Gefäßen nachgewiesen (Belton et al., 2000; Schönbeck et al., 1999). In Übereinstimmung mit diesen Daten wurde auch in der vorliegenden Arbeit eine stimulierende Wirkung von IL-1 β auf die Prostacyclinsynthese in Mesangiumzellen bestätigt. Unter Cerivastatin wurde die Produktion von dem Prostacyclin PGI₂ signifikant stärker. Dieses Ergebnis unterstreicht den protektiven Statineffekt, da Prostacycline antiatherogen und vasodilatativ wirken. Durch den Einsatz des selektiven COX-2-Hemmers Celecoxib wurde bestätigt, dass die Prostacyclinsynthese der mit IL-1 β und Cerivastatin behandelten Mesangiumzellen COX-2-abhängig war.

Viele Wissenschaftler konnten zeigen, dass eine erhöhte Freisetzung von Prostaglandinen PGE₂ die cAMP-abhängige Proteinkinase A Signalübertragung aktivieren (Hughes et al., 1995; Bornfeldt et al., 1997). Durch die Aktivierung der PKA-Signalübertragung kommt es zur Wachstumshemmung der Mesangiumzellen via eine Aktivitätsreduktion von MAP-Kinasen (Haneda et al., 1996; Togawa et al., 1997). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob eine Blockade der Prostaglandinsynthese die antiproliferative Wirkung von Cerivastatin aufheben kann, und somit erklärt werden, ob eine erhöhte Prostaglandinbildung an der durch

Cerivastatin hervorgerufenen Proliferationshemmung beteiligt ist. Hierzu wurde die DNA-Synthese der mit IL-1 β stimulierten und mit Cerivastatin mit Celecoxib (einem selektiven COX-2-Hemmer) oder Indomethacin (einem unselektiven COX-Hemmer) behandelten Zellen untersucht. Wie die Analyse der NO-Bildung und die Untersuchung der Protein-Expression im Western-Blot (diese Ergebnisse wurden nicht präsentiert) ergaben, wiesen beide COX-Hemmer keinen Einfluss auf iNOS-Expression und -Aktivität auf.

Überraschenderweise resultierte eine Hemmung der Prostaglandinproduktion durch eine Koinkubation der Zellen mit Celecoxib nicht mit einem Umkehren der antiproliferativen Wirkung von Cerivastatin. Eine Analyse der DNA-Synthese ergab, dass Celecoxib sogar ab einer Konzentration von 5 μ M den BrdU-Einbau in die DNA der proliferierenden Zellen signifikant und konzentrationsabhängig hemmen konnte. Wurden die Zellen mit beiden Medikamenten Cerivastatin plus Celecoxib behandelt, wurde die BrdU-Einbaurrate noch stärker und signifikant gehemmt. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die Hemmung der DNA-Synthese unter Cerivastatin oder Celecoxib in MZ unabhängig von Prostaglandinproduktion verläuft.

Ähnliche Ergebnisse wurden erzielt, wenn die Zellen mit Indomethacin (ein unselektiver COX-Hemmer) behandelt wurden. Auch in diesem Fall fand eine Abnahme der BrdU-Einbaurrate unter Indomethacin ab Konzentration 20 μ M statt, und diese wurde stärker, wenn die Zellen mit Cerivastatin plus Indomethacin inkubiert worden waren. Darüber hinaus korrelierte der antiproliferative Effekt von Cerivastatin und Indomethacin mit einer gestiegenen Proteinexpression von COX-2. Schon früher beobachteten Klein et al., (1994), dass der hemmende Effekt von *non-steroidal anti-inflammatory drugs* (NSAIDs), zu denen Indomethacin gehört, auf die Cyclooxygenasen-abhängige Prostaglandinsynthese nicht mit einer unterdrückten Cyclooxygenase-Expression verbunden ist, sondern mit deren inhibierenden Wirkung auf die enzymatische Cyclooxygenase - Aktivität. Durch die Inhibierung der Aktivität der COX-2 kommt es zur Hemmung der Prostacyclin- und Prostaglandinsynthese u. a. von 15d-PGJ₂, das eine wichtige Rolle als ein intrazellulärer Mediator in dem negativen Feedback Mechanismus von COX-2 Expression in renalen inflammatorischen Prozessen spielen kann (Sawano et al., 2002). Einer der frühen Produkte der aktivierten COX-2 stellt das Prostaglandin D₂ (PGD₂) dar, das schnell

zu PGJ_2 , dann zu $\Delta^{12}\text{PGJ}_2$ und anschließend durch eine nicht-enzymatische Dehydratation zu 15-d-PGJ_2 konvertiert wird. J-Prostaglandine sind bekannt als natürliche Liganden von *peroxisome proliferator-activated receptor* γ ($\text{PPAR}\gamma$) (Forman et al., 1995; Kliewer et al., 1995) und bewirken eine Suppression der viralen Replikation und Inflammation (Fukushima, 1992). Es wurde berichtet, dass bei Epithelzellen (Subbaramaiah et al., 2001) und bei Makrophagen (Inoue et al., 2000) 15-d-PGJ_2 die COX-2-Expression via $\text{PPAR}\gamma$ -abhängige Weise hemmen kann. Bei anderen Zelltypen wurde ein $\text{PPAR}\gamma$ -unabhängiger Mechanismus der Wirkung von 15-d-PGJ_2 festgestellt, der über eine Inhibierung von IKK-Aktivierung und der DNA-Bindungsaktivität von NF- κB vorkommt (Chawla et al., 2001; Vaidya et al., 1999). Demgegenüber zeigten aber Sawano et al. (2002), dass die von $\text{PPAR}\gamma$ -unabhängige inhibierende Wirkung von 15-d-PGJ_2 auf die COX-2-Expression bei MZ nicht über den NF- κB vermittelt wird, sondern über eine Suppression von ERK und JNK Signalwegen und der Bindungsaktivität von AP-1 abläuft. Unterstützt durch diese Daten könnte erklärt werden, warum eine Hochregulierung von COX-2-Expression trotz einer hemmenden Wirkung von COX-Inhibitoren auf die Prostacyclinsynthese in der vorliegenden Arbeit stattfand. Eine Inkubation der Zellen mit Celecoxib bewirkte eine Hemmung der Prostacyclinsynthese und anscheinend eine Blockierung der Prostaglandinproduktion u. a. PGD_2 , woraus ein Defizit von 15-d-PGJ_2 resultierte. Schließlich konnte es aufgrund des Mangels an Prostacyclinen und Prostaglandinen wahrscheinlich zur verstärkten COX-2-Expression unter COX-Hemmern kommen. Dabei lassen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit schlussfolgern, dass Prostacyclin PGI_2 ähnlich wie 15-d-PGJ_2 als Mediator des negativen Feedback Mechanismus der COX-2-Expression in den MZ dienen könnte.

Des Weiteren präsentierte eine Arbeit von Zahner et al. (2002), dass eine Hochregulierung von COX-2-Expression unabhängig von Prostaglandinsynthese zur Proliferationshemmung von Mesangiumzellen führte, was durch eine Induktion des *tumor suppressors gens* p53 und von den *cyclin dependent kinase inhibitors* (CDK) p21^{cip-1} und p27^{kip-1} vermittelt wurde. Diese Daten könnten erklären, dass die in der vorliegenden Arbeit beobachtete antiproliferative Wirkung von COX-Inhibitoren wahrscheinlich eine Folge der erhöhten COX-2-Expression sind. Die Zytotoxizität,

gemessen im LDH-Test, bei Zellen, die der Wirkung von Cerivastatin mit Celecoxib ausgesetzt worden waren, wurde signifikant geringer als bei Zellen, die nur mit Cerivastatin alleine behandelt wurden. Dies könnte auch für einen zytoprotektiven Effekt der COX-2 sprechen, was durch das antiapoptotisch gegen p53 wirkende p21 vermittelt werden könnte (Gorospe et al., 1997).

In manchen Studien wurde nachgewiesen, dass COX-2 über PGE₂ die Expression von *dynein light chain* (DLC) stimuliert, wodurch letztendlich die nNOS (neuronal NO-Synthase) inhibiert wird und somit die Zellen vor Apoptose geschützt werden (Chang et al., 2000). Bei Mesangiumzellen zeigte Ishaque et al. (2003) ebenso, dass COX-2 über eine erhöhte Produktion der Prostaglandinen PGE₂ und PGI₂ Apoptose inhibiert. Auch in der vorliegenden Arbeit könnten die unter Cerivastatin verstärkte COX-2 Expression und -Aktivität als ein Schutzmechanismus der Zellen vor der durch erhöhte NO-oder andere Faktoren-vermittelten Apoptose gesehen werden. Wie viele Untersuchungen belegten, ist die Balance zwischen pro- und antiapoptotischen Effekten sehr wichtig und entscheidet über den zellschädigenden oder zellschützenden Wirkmechanismus von NO (Brüne et al., 1997, 1998a; Sandau et al., 1997a, 1997b).

Möglicherweise soll die protektive Wirkung von NO über die Aktivierung der COX-2 vermittelt werden (Brüne et al., 1997, 1998a,b). Um zu überprüfen, ob Cerivastatin über NO oder einen anderen Signalweg Apoptose bei MZ auslöst oder CDK-Inhibitoren beeinflussen kann, sind noch weitere Untersuchungen erforderlich.

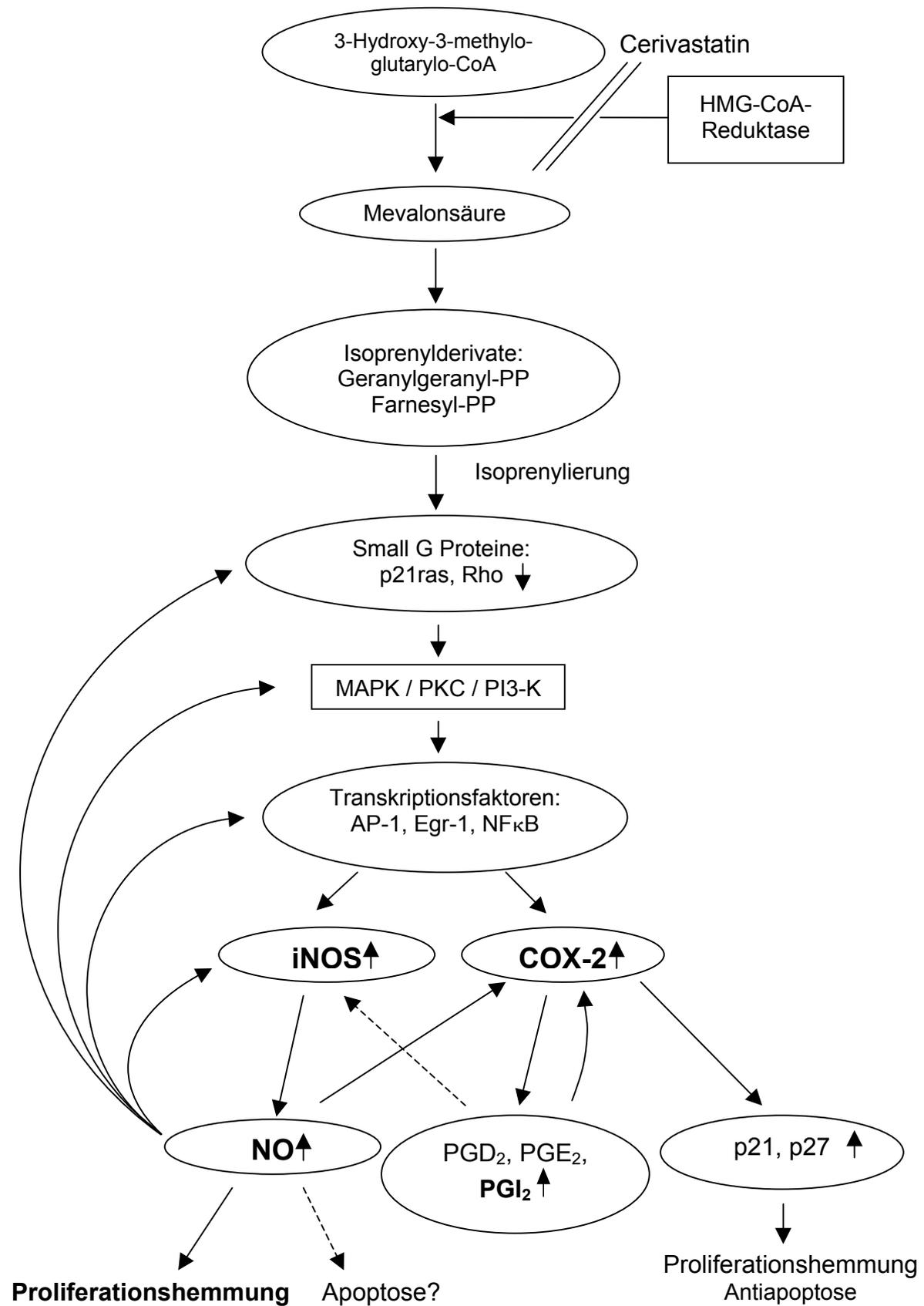


Abbildung 5-5: Möglicher Wirkmechanismus von Cerivastatin an MZ.

Zusammenfassend belegen die Befunde der vorliegenden Arbeit, dass Cerivastatin über einen NO-abhängigen Signalweg die Proliferation der Mesangiumzellen inhibiert (Abb. 5-5). Unter Cerivastatin konnte die mit Zytokinen induzierte NO-Bildung via iNOS potenziert werden und infolgedessen die Proliferation der MZ gehemmt werden. Dieser Hemmeffekt von Cerivastatin beinhaltet möglicherweise eine durch vermehrte NO-Bildung induzierte Apoptose. Diese Frage müssen weitere Untersuchungen klären. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die durch NO-vermittelte antiproliferative Wirkung von Cerivastatin unabhängig von der Prostaglandin-synthese verläuft. Dabei könnten die unter Cerivastatin verstärkte COX-2-Expression und -Aktivität als ein zytoprotektiver Faktor angesehen werden.

Eine unter Cerivastatin erhöhte iNOS-Expression und -Aktivität und erhöhte COX-2-Expression und -Aktivität stellt ein Gegengewicht der durch Zytokine induzierten Proliferation und des oxidativen Stresses in einer entzündeten Niere dar und können einer Optimierung der renalen Hämodynamik dienen. Somit könnten Statine nützlich in der Therapie von renalen Erkrankungen sein.

6. Zusammenfassung

Eine ungehemmte Proliferation von Mesangiumzellen kann im Rahmen einer Glomerulonephritis zu einer Glomerulosklerose führen. Hierbei stellt die autokrine Synthese von Wachstumsfaktoren wie PDGF-BB einen wesentlichen pathogenen Faktor dar. Auch andere Faktoren wie hoher Blutdruck, toxische, metabolische oder immunologische Einflüsse können die Pathogenese einer GN vorantreiben und begünstigen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde in einer Zellkultur die durch verschiedene Agonisten (FCS, PDGF-BB, Ang II, IL-1 β) ausgelöste mesangiale Proliferation unter dem Einfluss von:

- den Immunsuppressiva CyA, FK-506 und MPA (aktiver Metabolit von MMF),
- dem ACE-Hemmer Ramiprilat (aktiver Metabolit von Ramipril) und dem AT1-Rezeptorblocker Valsartan,
- sowie dem Inhibitor der HMG-CoA-Reduktase Cerivastatin

untersucht. Darüber hinaus sollte versucht werden zu klären, auf welche Weise die Pharmaka auf die durch verschiedene Entzündungsreize gestörte Autoregulation von Mesangiumzellen wirken. Dabei diene die mesangiale Zellkultur als ein zelluläres Modell für die pathogenetischen Vorgänge bei einer Glomerulonephritis als auch für die Vorgänge der chronischen Abstoßungsreaktion in der Transplantatniere.

Einfluss von Immunsuppressiva auf Mesangiumzellen

Untersuchungen der Proliferation (BrdU-Assay, MTT-Test, Zellzahlbestimmung im Trypanblau-Test) und der Toxizität (LDH-Test) ergaben, dass nur MPA im therapeutisch relevanten Bereich ($IC_{50} = 0,44 - 0,52 \mu M$) die mesangiale Proliferation konzentrationsabhängig und ohne toxische Effekte hemmen konnte. Die anti-proliferative Wirkung von CyA war eher auf die Toxizität dieses Medikaments zurückzuführen (ab $5 \mu M$ betrug die Zytotoxizität mehr als 30%). Demgegenüber war FK-506 weniger toxisch als CyA, jedoch im klinischen Bereich nicht effektiv. Die Stimulation von MZ mit PDGF-BB löste eine sehr starke signifikante Transkription von c-fos und Egr-1 aus, mit einer für diese Gene typischen Zeitkinetik (Maximum bei 30 min) (RT-PCR). Eine verstärkte Expression von PDGF-B wurde sowohl auf

mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene bewiesen. Somit wurde die Fähigkeit der MZ zur autokrinen Synthese von PDGF-B bestätigt. MPA zeigte eine signifikante Hemmung auf c-fos- und Egr-1-Genexpression. MPA konnte auch die Gen- und Proteinexpression von PDGF-B inhibieren. Die Proteinexpression von PDGF-Rezeptor- β blieb unter MPA unverändert. Es konnte auch kein Effekt unter MPA auf die durch PDGF-BB induzierte AP-1-Aktivität festgestellt werden. Anhand der Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass die antiproliferative Wirkung von MPA auf MZ partiell ein Resultat der Inhibition der autokrinen Synthese von PDGF-B und der reduzierten Expression von Egr-1 und/oder c-fos sein könnte. Die therapeutisch nutzbare, wachstumshemmende Wirkung von MPA beinhaltet also möglicherweise diese Effekte. Für die Klärung, ob diese Effekte abhängig oder unabhängig von IMPDH-Inhibierung sind, müssen noch weitere Untersuchungen folgen

Einfluss von ACE-Hemmern und AT1-Rezeptorblockern auf Mesangiumzellen

In der vorliegenden Arbeit wurde unter Ang II (0,1 μ M; 1 μ M; 10 μ M) eine signifikant erhöhte Proteinzunahme und DNA-Synthese bei einer Zellzahlabnahme und eine signifikant verstärkte Egr-1-mRNA-Expression festgestellt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Ang II eine Hypertrophie mit einer Endoreduplikation bei Mesangiumzellen auslösen kann. Diese Resultate, unterstützt durch Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, lassen vermuten, dass sich wahrscheinlich aufgrund einer Aktivierung der Egr-1-abhängigen TGF- β -Signalwege und der Inaktivierung des Transkriptionsfaktors E2F unter Ang II Wirkung eine Zellhypertrophie mit Endoreduplikation entwickeln könnte.

Unter dem ACE-Hemmer Ramiprilat (bis 20 μ M) wurden keine Änderungen der durch Ang II ausgelösten Effekte nachgewiesen. Die fehlende Reaktion der MZ auf die Behandlung mit Ramiprilat gibt einen Hinweis, dass in den untersuchten MZ wahrscheinlich kein lokales RAS vorhanden war. Im Gegensatz dazu konnten die über Ang II-vermittelten Effekte (Zellhypertrophie, Endoreduplikation, Egr-1 Expression) durch eine Behandlung der Zellen mit dem AT1-Rezeptorblocker Valsartan (0,1-10 μ M) reduziert werden. Diese Resultate deuten daraufhin, dass die Zellhypertrophie und Endoreduplikation entscheidend über den AT1-Rezeptor vermittelt werden. Diese molekulare Effekte können ein Teil der bekannten

nephroprotektiven Wirkung der AT1-Rezeptorantagonisten im Rahmen der GN-Therapie sein. Ob eine Hemmung der Zykline/CDKs durch CDK-Inhibitoren p21 und p27 unter Valsartan antagonisiert werden kann, muss noch in weiteren Untersuchungen geprüft werden. Eine signifikante Zellzahlabnahme unter Ang II war nicht mit einer Toxizität (gemessen im LDH-Test) verbunden. Die Ang II-Wirkung konnte durch Valsartan antagonisiert werden, aber nur bei 0,1 μM Ang II wurde die Zellzahl auf das Niveau der unbehandelten Kontrolle zurückgebracht. Dies deutet auf mögliche über den AT-2 vermittelte antiproliferative Effekte von Ang II an Mesangiumzellen hin. Auch hier ist in zukünftigen Untersuchungen zu klären, welche Mechanismen durch die Blockade des AT1-Rezeptors via AT2 moduliert werden.

Einfluss von Cerivastatin auf Mesangiumzellen

Anhand der Analyse der DNA-Synthese im BrdU-Assay und des MTT-Testes konnte gezeigt werden, dass Cerivastatin konzentrationsabhängig die Proliferation der Mesangiumzellen inhibieren konnte. Diese hemmende Wirkung korrelierte mit einer signifikant erhöhten NO-Bildung. Bis zur 0,1 μM Cerivastatin war dieser Effekt nicht mit einer Zellyse verbunden (Zytotoxizität im LDH-Test lag unter 10%). Dabei wurde festgestellt, dass Cerivastatin die Mesangiumzellen per se zu keiner signifikanten iNOS-mRNA-/Proteinexpression und NO-Synthese stimuliert, sondern nur die durch IL-1 β ausgelöste iNOS-Expression und NO-Bildung potenzieren kann. Diese potenzierende Wirkung von Cerivastatin auf die NO-Bildung konnte durch eine Koinkubation mit Mevalonat (100 μM) revidiert werden. Des Weiteren konnte der antiproliferative Effekt und die verstärkte iNOS-Proteinexpression und NO-Bildung von Cerivastatin durch eine Koinkubation mit einem NOS-Inhibitor (L-NMMA oder L-NIL) antagonisiert werden. Unter dem Einfluss von Cerivastatin wurde auch eine signifikant erhöhte COX-2-Protein-Expression und eine signifikant vermehrte Bildung COX-2-abhängiger Prostacyclinen (PGI₂) gemessen. Eine Koinkubation der Zellen mit Celecoxib, einem selektiven COX-2-Hemmer resultierte trotz der vollständigen Inhibierung der Prostaglandinsynthese nicht in einer Aufhebung der antiproliferativen Effekte von Cerivastatin. Dieses Resultat deutet daraufhin, dass die proliferationshemmende Wirkung von Cerivastatin über einen NO-vermittelten Mechanismus, jedoch unabhängig von der Prostaglandinsynthese verläuft. Die unter

Cerivastatin erhöhte COX-2-Expression könnte dabei einen zytoprotektiven Faktor darstellen, der vor der durch erhöhte NO-Bildung vermittelten Apoptose schützen könnte. Ob Cerivastatin über NO oder einen anderen Signalweg Apoptose bei Mesangiumzellen auslöst, oder CDK-Inhibitoren p21 und p27 beeinflussen kann, müssen weitere Untersuchungen klären.

7. Literaturverzeichnis

- Abboud H, Bhandari B, Choudhury GG: Cell biology of platelet-derived growth factor. In: Molecular Nephrology. Kidney Function in Health and Disease, edited by Bonventre J and Schlondorf. New York: Dekker, p.573-590, 1995
- Abboud HE, Poptic E, Dicorleto PE: Production of platelet-derived growth factor-like protein by rat mesangial cells in culture. *J Clin Invest* 80: 675-683, 1987
- Abboud HE. Role of platelet-derived growth factor in renal injury. *Annu Rev Physiol.* 57:297-309, 1995
- Agodoa LY: The AASK Study. *JAMA* 2719-2728, 2001
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD: Molekularbiologie der Zelle. 1995
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG: Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357: 593-615, 2001
- Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P: Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . *Curr Biol* 7:261-9, 1997
- Ali MS, Sayeski PP, Dirksen LB, Hayser DJ, Marrero MB, Bernstein KE: Dependence on the motif YIPP for the physical association of JAK2 kinase with the intracellular carboxyl tail of the angiotensin II AT1 receptor. *J Biol Chem* 272: 23382-23388, 1997
- Allison AC, Almquist SJ, Muller CD, Eugui EM: In vitro immunosuppressive effects of mycophenolic acid and an ester pro-drug, RS-61443. *Transplant Proc* 23(2 Suppl 2):10-4, 1991
- Allison AC, Eugui EM: Immunosuppressive and other effects of mycophenolic acid and an ester prodrug, mycophenolate mofetil. *Immunol Rev* 136: 5-28, 1993
- Antoniades HN, Scher CD, Stiles CD. Purification of human platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 1809-13, 1979
- Araki S, Haneda M, Togawa M, Kikkawa R: Endothelin-1 activates c-jun NH₂-terminal kinase in mesangial cells. *Kidney Int* 51: 631-639, 1997
- Arbibe L, Mira JP, Teusch N, Kline L, Guha M, Mackman N, Godowski PJ, Ulevitch RJ, Knaus UG: Toll-like receptor 2-mediated NF- κ B activation requires a Rac1-dependent pathway. *Nat Immunol* 1: 533-540, 2000
- Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F: Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 3203-7, 1977
- Assreuy J, Cunha FQ, Liew FY, Moncada S: Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. *Br J Pharmacol* 108: 833-7, 1993
- Atiyeh B, Arant B, Heinrich W, Seikaly M: In vitro production of angiotensin II by isolated glomeruli. *Am J Physiol* 268: F266-F272, 1995
- Bachmann S, Bosse HM, Mundel P: Topography of nitric oxide synthesis by localizing constitutive NO synthases in mammalian kidney. *Am J Physiol* 268: F885-98, 1995
- Bachmann S, Mundel P: Nitric oxide in the kidney: synthesis, localization, and function. *Am J Kidney Dis* 24:112-29, 1994

- Baer PC, Wegner B, Geiger H: Effects of mycophenolic acid on IL-6 expression of human renal proximal and distal tubular cells *in vitro*. *Nephrol Dial Transplant* 19: 47-52, 2004
- Bai H, Pollman MJ, Inishi Y, Gibbons GH: Regulation of vascular smooth muscle cell apoptosis. Modulation of bad by a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Circ Res* 85: 229-237, 1999
- Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G: Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev* 7: 812-821, 1993
- Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G: Cyclin D1 is nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev* 7: 812-821, 1993
- Barros EJ, Boim MA, Ajzen H, Ramos OL, Schor N: Glomerular hemodynamics and hormonal participation on cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 32: 19-25, 1987
- Barros EJ, Boim MA, Santos OF, Moura LA, Ramos OL, Schor N: Short-term effects of cyclosporine on glomerular hemodynamics in rats. *J Nephrol* 4: 227-233, 1990
- Bar-Sagi D, Hall A : Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell* 103:227-38, 2000
- Baryalei M, Zenker D, Pieske B, Tondo K, Dalichau H, Aleksic I: Renal function and safety of heart transplant recipients switched to mycophenolate mofetil and low-dose cyclosporine. *Transplant Proc* 35: 1539-1542, 2003
- Bassa BV, Roh DD, Vaziri ND, Kirschenbaum MA, Kamanna VS: Effect of inhibition of cholesterol synthetic pathway on the activation of Ras and MAP kinase in mesangial cells. *Biochim Biophys Acta* 1449: 137-149, 1999
- Bates S, Ryan KM, Phillips AC, Vousden KH: Cell cycle arrest and DNA endoreduplication following p21Waf1/Cip1 expression. *Oncogene* 17: 1691-1703, 1998
- Bazenet CE, Kazlauskas A: The PDGF receptor alpha subunit activates p21ras and triggers DNA synthesis without interacting with rasGAP. *Oncogene* 9: 517-525, 1994
- Beck KF, Eberhardt W, Frank S, Huwiler A, Messmer UK, Muhl H, Pfeilschifter J: Inducible NO synthase: role in cellular signalling. *J Exp Biol* 202: 645-53, 1999
- Beck KF, Sterzel RB: Cloning and sequencing of the proximal promoter of the rat iNOS gene: activation of NFkappaB is not sufficient for transcription of the iNOS gene in rat mesangial cells. *FEBS Lett* 394: 263-7, 1996
- Becker BN, Yasuda T, Kondo S, Vaikunth S, Homma T, Harris RC: Mechanical stretch/relaxation stimulates a cellular renin-angiotensin system in cultured rat mesangial cells. *Exp Nephrol* 6:57-66, 1998
- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA: Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 1620-4, 1990
- Beckman JS, Koppenol WH: Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271: C1424-37, 1996
- Bekersky I, Dressler D, Mekki Q A: Dose linearity after oral administration of tacrolimus 1-mg capsules at doses of 3, 7, and 10 mg. *Clin Therapeut* 21: 2058-2064, 1999
- Belton O, Byrne D, Kearney D, Leahy A, Fitzgerald DJ. Cyclooxygenase-1 and -2-dependent prostacyclin formation in patients with atherosclerosis. *Circulation* 102:840-5, 2000

- Berendji D, Kolb-Bachofen V, Zipfel PF, Skerka C, Carlberg C, Kroncke KD: Zinc finger transcription factors as molecular targets for nitric oxide-mediated immunosuppression: inhibition of IL-2 gene expression in murine lymphocytes. *Mol Med* 5: 721-30, 1999
- Berk BC, Rao GN : Angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell hypertrophy: PDGF A-chain mediates the increase in cell size. *J Cell Physiol* 154:368-80, 1993
- Berk BC: Vascular smooth muscle Growth: autocrine Growth Mechanisms. *Physiol Rev* 81: 999-1030, 2001
- Bernstein KE, Berk BC: The biology of angiotensin II receptors. *Am J Kidney Dis* 22: 745-754, 1993
- Bischoff H, Heller AH: Preclinical and clinical pharmacology of cerivastatin. *Am J Cardiol* 82: 18J-25J, 1998
- Black MJ, Adams MA, Bobik A, Campbell JH, Campbell GR: Effect of enalapril on aortic smooth muscle cell polyploidy in the spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens* 7: 997-1003, 1989
- Blaheta RA, Witting B, Leckel K, Scholz M, Weber S, Kronenberger, Auth M, Encke A, Markus BH: Untersuchungen zur infiltrationshemmenden Eigenschaft von Mycophenolat Mofetil (CellCept®). *Transplantationsmedizin Tx Med* 9: 128-131, 1997
- Bornfeldt KB, Campbell JS, Koyama H, Argast GM, Leslie CC, Raines EW, Krebs EG, Ross R: The mitogen-activated protein kinase pathway can mediate growth inhibition and proliferation in smooth muscle cells. *J Clin Invest* 100: 875-885, 1997
- Boucher JL, Moali C, Tenu JP: Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilisation. *CMLS Cell Mol Life Sci* 55: 1015-1028, 1999
- Bradford, M: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976
- Braam B, Koomans H: Renal responses to antagonism of the reninangiotensin system. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 5: 89-96, 1996
- Brandt SJ, Bodine DM, Dunbar CE, Nienhuis AW: Dysregulated interleukin 6 expression produces a syndrom resembling Castleman's disease in mice. *J Clin Invest* 86: 592-599, 1990
- Bruick RK: Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 9082-9087, 2000
- Brüne B, Gotz C, Messmer UK, Sandau K, Hirvonen MR, Lapetina EG: Superoxide formation and macrophage resistance to nitric oxide-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 272: 7253-8, 1997
- Brüne B, Sandau K, von Knethen A: Apoptotic cell death and nitric oxide: activating and antagonistic transducing pathways. *Biochemistry (Mosc)* 63: 817-25, 1998a
- Brüne B, von Knethen A, Sandau KB: Nitric oxide and its role in apoptosis. *Eur J Pharmacol* 351: 261-72, 1998 b
- Buchkovich K, Duffy LA, Harlow E: The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phase of the cell cycle. *Cell* 58: 109-1105, 1989
- Buemi M, Allegra A, Corica F, Aloisi C, Giacobbe M, Pettinato G, Corsonello A, Senatore M, Frisina N: Effect of fluvastatin on proteinuria in patients with immunoglobulin A nephropathy. *Clin Pharmacol Ther* 67: 427-31, 2000

- Buschhausen L, Seibold S, Gross O, Matthaues T, Weber M, Schulze-Lohoff E: Regulation of mesangial cell function by vasodilatory signalling molecules. *Cardiovasc Res* 51:463-9, 2001
- Butler AR, Flitney FW, Williams DL: NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective. *Trends Pharmacol Sci* 16: 18-22, 1995, Comment in: *Trends Pharmacol Sci* 16: 293, 1995
- Callsen D, Pfeilschifter J, Brune B: Rapid and delayed p42/p44 mitogen-activated protein kinase activation by nitric oxide: the role of cyclic GMP and tyrosine phosphatase inhibition. *J Immunol* 161: 4852-8, 1998
- Campbell DJ, Kladis A, Duncan AM: Effects of converting enzyme inhibitors on angiotensin and bradykinin peptides. *Hypertension* 23: 439-49, 1994
- Cantley LC: The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296: 1655-1657, 2002
- Cao X, Koski RA, Gashler A, McKiernan M, Morris CF, Gaffney R, Hay RV, Sukhatme VP: Identification and characterisation of the Egr-1 gene product, a DNA-binding zinc finger protein induced by differentiation and growth signals. *Mol Cell* 10: 1931-1939, 1990
- Carl M, Akagi Y, Weidner S, Isaka Y, Imai E, Rupperecht HD: Specific inhibition of Egr-1 prevents mesangial hypercellularity in experimental nephritis. *Kidney Int* 63: 1302-1312, 2003
- Carl VS, Brown-Steinke K, Nicklin MJ, Smith MF Jr: Toll-like receptor 2 and 4 (TLR2 and TLR4) agonists differentially regulate secretory interleukin-1 receptor antagonist gene expression in macrophages. *J Biol Chem* 277: 17448-17456, 2002
- Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshert E: Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 394: 485-490, 1998
- Carmines PK, Fleming JT: Control of the renal microvasculature by vasoactive peptides. *FASEB J* 4: 3300-3309, 1990
- Casey PJ: Biochemistry of protein prenylation. *J Lipid Res* 33: 1731-1740, 1992
- Cattell V, Cook T: The nitric oxide pathway in glomerulonephritis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 4: 359-64, 1995
- Cattell V: Macrophages in acute glomerular inflammation. *Kidney Int* 45: 945-52, 1994
- Cattell V: Nitric oxide and glomerulonephritis. *Semin Nephrol* 19: 277-87, 1999
- Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT: Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res* 16:11141-56, 1988
- 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
- Chang L, Karin M: Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410: 37-40, 2001
- Chang YW, Jakobi R, McGinty A, Foschi M, Dunn MJ, Sorokin A: Cyclooxygenase-2 promotes cell survival by stimulation of dynein light chain expression and inhibition of neuronal nitric oxide synthase activity. *Mol Cell Biol* 20: 8571-8579, 2000

Chawla A, Barak Y, Nagy L, et al: PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat Med* 7: 48-52, 2001

Chen H, Lu ZZ, Wei H, Han C: Induction of ICE and inhibition of c-fos, jun D and zif 268 in 12-month old spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 61: PL27-31, 1997

Chen RH, Abate C, Blenis J: Phosphorylation of the c-Fos transrepression domain by mitogen-activated protein kinase and 90-kDa ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10952-6, 1993

Chen S, Zhou H, Wang L, Et Al: The effect of losartan intervention on the regulation of pulmonary arterial collagen expression by protein kinase C in chronic hypoxic rat models. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 41:444-9, 2002

Chiara M, Menegatti E, Di Simone D, Davit A, Bellis D, Sferch D, De Rosa G, Giachino O, Sena LM, Rocatello D: Mycophenolate Mofetil and roscovitine decrease cyclin expression and increase p27 expression in anti Thy1 mesangial proliferative nephritis. *Clin Exp Immunol* 139: 225-235, 2005

Chibazakura T, McGrew SG, Cooper JA, Yoshikawa H, Roberts JM: Regulation of cyclin-dependent kinase activity during mitotic exit and maintenance of genome stability by p21, p27, and p107. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 4465-4470, 2004

Cho HJ, Xie QW, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Nathan C, Beatrice and Samuel A: Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J Exp Med* 176: 599-604, 1992

Choudhury GG, Karamitsos C, Hernandez J, Gentilini A, Bardgette J, Abboud HE: PI-3-kinase and MAPK regulate mesangial cell proliferation and migration in response to PDGF. *Am J Physiol Renal Physiol* 273: F931-F938, 1997

Choudhury GG, Kim YS, Simon M, Wozney J, Harris S, Choudhury GN, Abboud HE: Bone morphogenetic protein 2 inhibits platelet-derived growth factor-induced c-fos gene transcription and DNA synthesis in mesangial cells. Involvement of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 274: 10897-10902, 1999

Choudhury GG, Marra F, Kiyamoto H, Abboud HE: PDGF stimulates tyrosine phosphorylation of JAK 1 protein tyrosine kinase in human mesangial cells. *Kidney Int* 49: 19-25, 1996

Choudhury GG: Akt serine threonine kinase regulates platelet-derived growth factor –induced DNA synthesis in glomerular mesangial cells. Regulation of c-fos and p27^{kip1} gene expression. *J Biol Chem* 276: 35636-35643, 2001

Chung O, Unger T: Angiotensin II receptor blockade and end-organ protection. *Am J Hypertens* 12:150S-156S, 1999

Clipstone NE, Crabtree GR: Calcineurin is a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation and the target of immunosuppressive drugs CsA and FK-506. *Ann N Y Acad Sci* 1993

Clipstone NE, Crabtree GR: Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 357: 695, 1992

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

Criscione L, de Gasparo M, Buhlmayer 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

- Danesh FR, Sadeghi MM, Amro N, Philips C, Zeng L, Lin S, Sahai A, Kanwar YS: 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors prevent high glucose-induced proliferation of mesangial cells via modulation of Rho GTPase/p21 signalling pathway: implication for diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8301-5, 2002
- de Gasparo M, Whitebread S: Binding of valsartan to mammalian angiotensin AT1 receptors. *Regul Pept* 59:303-11, 1995
- De Nicola L, Blantz RC, Gabbai FB: Nitric oxide and angiotensin II: Glomerular and tubular interaction in the rat. *J Clin Invest* 89: 1248-1256, 1992
- Degraeve F, Bolla M, Blaie S, Creminon C, Quere I, Boquet P, Levy-Toledano S, Bertoglio J, Habib A: Modulation of COX-2 expression by statins in human aortic smooth muscle cells. Involvement of geranylgeranylated proteins. *J Biol Chem* 276: 46849-46855, 2001
- Deguchi J, Makuuchi M, Nakaoka T, Collins T, Takuwa Y: Angiotensin II stimulates platelet-derived growth factor-B chain expression in newborn rat vascular smooth muscle cells and neointimal cells through Ras, extracellular signal-regulated protein kinase, and c-Jun N-terminal protein kinase mechanisms. *Circ Res* 85:565-74, 1999
- Demetris AJ, Banner B, Fung J, Jordan M, Starzl TE: Histopathology of human renal allograft rejection under FK-506: a comparison with cyclosporine. *Transplant Proc* 23: 944-946, 1991
- Denninger JW, Marletta MA: Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* 1411: 334-350, 1999
- Dilworth DD, McCarrey JR: Single-step elimination of contaminating DNA prior to Reverse Transcriptase PCR. *PCR Methods Appl* 1: 279-282, 1992
- Douglas JG, Romero M, Hopfer U: Signaling mechanisms coupled to the angiotensin receptor of proximal tubular epithelium. *Kidney Int* 38: 43-47 (Suppl 30), 1990
- Doyle AG, Herbein G, Montaner LJ, Minty AJ, Caput D, Ferrara P, Gordon S: Interleukin-13 alters the activation state of murine macrophages in vitro: comparison with interleukin-4 and interferon-gamma. *Eur J Immunol* 24: 1441-5, 1994
- Dubus I, Vendraly B, Christophe I, Labouyrie JP, Delmas Y, Bonne J, Combe C: Mycophenolic acid antagonizes the activation of cultured human mesangial cells. *Kidney Int* 62: 857-67, 2002
- Duff JL, Berk BC, Corson MA: Angiotensin II stimulates the pp44 and pp42 mitogen-activated protein kinases in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 188: 257-264, 1992
- Duhe RJ, Evans GA, Erwin RA, Kirken RA, Cox GW, Farrar WL: Nitric oxide and thiol redox regulation of Janus kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 126-31, 1998
- Eberhardt W, Kunz D, Pfeilschifter J: Pyrrolidine dithiocarbamate differentially affects interleukin 1 beta- and cAMP-induced nitric oxide synthase expression in rat renal mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 200: 163-70, 1994
- Eberhardt W, Pluss C, Hummel R, Pfeilschifter J: Molecular mechanisms of inducible nitric oxide synthase gene expression by IL-1beta and cAMP in rat mesangial cells. *J Immunol* 160: 4961-9, 1998
- Edwards RM, Aiyar N: Angiotensin II receptor subtypes in the kidney. *J Am Soc Nephrol* 3: 1643-1652, 1993
- Eguchi S, Inagami T: Signal transduction of angiotensin II type 1 receptor through receptor tyrosine kinase. *Regul Pept* 91: 13-20, 2000

Eguchi S, Numaguchi K, Iwasaki H, Matsumoto T, Yamakawa T, Utsunomiya H, Motley ED, Kawakatsu H, Owada KM, Hirata Y, Marumo F, Inagami T: Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 273: 8890-8896, 1998

el-Husseini A el-D, Paterson JA, Shiu RP: Basic fibroblast growth factor (bFGF) and two of its receptors, FGFR1 and FGFR2: gene expression in the rat brain during postnatal development as determined by quantitative RT-PCR. *Mol Cell Endocrinol* 104:191-200, 1994

Eng E, Floege J, Young BA, Couser WG, Johnson RJ: Does extracellular matrix expansion in glomerular disease require mesangial cell proliferation? *Kidney Int* 45: S45-47, 1994

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:S8-11, 1995

Ewen ME, Sluss HK, Sherr CJ, Matsushime H, Kato J, Livingston DM: Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* 73: 487-497, 1993

Fairbanks KP, Witte LD, Goodman DS: Relationship between mevalonate and mitogenesis in human fibroblasts stimulated with platelet-derived growth factor. *J Biol Chem* 259: 1546-1551, 1984

Fasciolo JC: The experimental observation that led to the discovery of angiotensin. 1939 Buenos Aires, Argentina. *Hypertension* 16: 194-198, 1990

Fattori E, Della Rocca C, Costa P, Giorgio M, Dente B, Pozzi L, Ciliberto G: Development of progressive kidney damage and myeloma kidney in interleukin 6 transgenic mice. *Blood* 83: 2570-2579, 1994

Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, Semenza GL: Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res* 59: 3915-3918, 1999

Flangan WM, Corthesy B, Bram RJ, Crabtree GR: Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A. *Nature* 352: 803, 1991

Floege J, Eng E, Young BA, Alpers CE, Barret TB, Bowen-Pope DF, Johnson RJ: Infusion of platelet-derived growth factor or basic fibroblast growth factor induces selective glomerular mesangial cell proliferation and matrix accumulation in rats. *J Clin Invest* 92: 2952-2962, 1993

Floege J, Topley N, Hoppe J, Barret TD, Resch K: Mitogenic effect of platelet-derived growth factor isoforms in cultured human glomerular mesangial cells: modulation and/or suppression by inflammatory cytokines. *Clin Exp Immunol* 86: 334-341, 1991a

Floege J, Topley N, Resch K: Regulation of Mesangial Cell Proliferation. *Am J Kidney Dis* 17: 673-676, 1991b

Folli F, Kahn CR, Hansen H, Bouchie JL, Feener EP: Angiotensin II inhibits insulin signaling in aortic smooth muscle cells at multiple levels. A potential role for serine phosphorylation in insulin/angiotensin II crosstalk. *J Clin Invest* 100: 2158-69, 1997

Forman BM, Tontonoz P, Chen J, et al : 15-Deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 83: 803-812, 1995

Freeman RS, Hasbani DM, Lipscomb EA, Straub JA, Xie L: SM-20, EGL-9, and EGLN family of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylases. *Mol Cells* 16: 1-12, 2003

Fruman DA, Mather PE, Burakoff SJ, Bierer BE: Correlation of calcineurin phosphatase activity and programmed cell death in T-cell hybridomas. *Eur J Immunol* 22: 2513, 1992

Fu M, Zhang J, Lin Y, Zhu X, Ehrenguber MU, Chen YE: Early growth response factor-1 is a critical transcriptional mediator of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 1 gene expression in human aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 277: 26808-26814, 2002

Fukushima M: Biological activities and mechanism of action of PGJ₂ and related compounds: an update. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 47: 1-12, 1992

Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-6, 1980

Furusu A, Miyazaki M, Abe K, Tsukasaki S, Shiohita K, Sasaki O, Miyazaki K, Ozono Y, Koji T, Harada T, Sakai H, Kohno S: Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase in human glomerulonephritis. *Kidney Int* 53:1760-8, 1998

Gabor R: p53-abhängige Endoreduplikation als folge der SV40-Infektion. VWF Verlag für Wissenschaft und Forschung, 2000

Galvin DJ, Watson RW, O'Neill, Coffey RN, Taylor C, Gillespie JI, Fitzpatrick JM: Hypoxia inhibits human bladder smooth muscle cell proliferation: a potential mechanism of bladder dysfunction. *Neurourol Urodyn* 23: 342-348, 2004

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: S37-42, 1994

Ganz MB, Perfetto M, Boron WF: Effects of mitogens and other agents on rat mesangial cell proliferation, pH, and Ca²⁺. *Am J Physiol* 259: f269-278, 1990

Gaston B: Nitric oxide and thiol groups. *Biochim Biophys Acta* 1411: 323-33, 1999

Gesualdo L, Di Paolo S, Ranieri E, Schena FP, Brunaccini A: Trepidil inhibits human mesangial cell proliferation: Effect on PDGF β-receptor binding and expression. *Kidney Int* 46: 1002-1009, 1994

Gesualdo L, Pinzani M, Floriano JJ, Hassan MO, Nagy NU, Schena FP, Emancipator SN, Abboud HE: Platelet-derived growth factor expression in mesangial proliferative glomerulonephritis. *Lab Invest* 65: 160-167, 1991

Gheith OA, Sobh MA, Mohamed Kel-S, El-Baz MA, El-Husseini F, Gazarin SS, Ahmed HA, Rasem MW, Amer GM: Impact of treatment of dyslipidemia on renal function, fat deposits and scarring in patients with persistent nephrotic syndrome *Nephron* 91: 612-9, 2002

Gibbons GH, Pratt RE, Dzau VJ: Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia. Autocrine transforming growth factor-β1 expression determine growth response to angiotensin II. *J Clin Invest* 90: 456-461, 1992

Gopalakrishna R, Chen ZH, Gundimeda U: Nitric oxide and nitric oxide-generating agents induce a reversible inactivation of protein kinase C activity and phorbol ester binding. *J Biol Chem* 268: 27180-5, 1993

Goppelt-Struebe M, Fickel S, Reiser CO: The platelet-derived-growth-factor receptor, not the epidermal-growth-factor receptor, is used by lysophosphatidic acid to activate p42/44 mitogen-actiated protein kinase and to induce prostaglandin G/H synthase-2 in mesangial cells. *Biochem J* 2: 217-224, 2000

Gorospe M, Cirielli C, Wang X, Seth P, Capogrossi MC, Hollbrook NJ: p21(Waf1/Cip1) protects against p53-mediated apoptosis of human melanoma cells. *Oncogene* 14: 929-935, 1997

- Goto M, Mukoyama M, Suga S, Matsumoto T, Nakagawa M, Ishibashi R, Kasahara M, Sugawara A, Tanaka I, Nakao K: Growth-dependent induction of Angiotensin II Type 2 receptor in rat mesangial cells. *Hypertension* 30:358-362, 1997
- Gottifredi V, McKinney K, Poyurovsky MV, Prives C: Decreased p21 levels are required for efficient restart of DNA synthesis after S phase block. *J Biol Chem* 279: 5802-5810, 2004
- Grandaliano G, Biswas P, Choudhury GG, Abboud HE: Simvastatin inhibits PDGF-induced DNA synthesis in human glomerular mesangial cells. *Kidney Int* 44: 503-508, 1993
- Granger RL, Hughes TR, Ramiji DP: Gene, stimulus and cell-type specific regulation of activator protein-1 in mesangial cells by lipopolysaccharide and cytokines. *Biochim Biophys Acta* 1492: 100-107, 2000
- Greco S, Muscella A, Elia MG, Salvatore P, Storelli C, Marsigliante S.J: Activation of angiotensin II type I receptor promotes protein kinase C translocation and cell proliferation in human cultured breast epithelial cells. *Endocrinol* 174:205-14, 2002
- Greco S, Muscella A, Elia MG, Salvatore P, Storelli C, Mazzotta A, Manca C, Marsigliante S: Angiotensin II activates extracellular signal regulated kinases via protein kinase C and epidermal growth factor receptor in breast cancer cells. *J Cell Physiol* 196:370-7, 2003
- Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW: Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 74:1141-8, 1994
- Griffith BP, Hardesty RL, Trento A, Lee A, Baknson HAT: Targeted blood levels of cyclosporin for cardiac transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 88: 952-957, 1984
- Griscavage JM, Rogers NE, Sherman MP, Ignarro LJ: Inducible nitric oxide synthase from a rat alveolar macrophage cell line is inhibited by nitric oxide. *J Immunol* 151: 6329-37, 1993
- Grond J, Koudstaal J, Elema JD: Mesangial function and glomerular sclerosis in rats with aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 27: 405-410, 1985
- Gröne HJ, Simon M, Fuchs E: Autoradiographic characterization of angiotensin receptor subtypes in fetal and adult human kidney. *Am J Physiol* 262: F326-331, 1992
- Guha M, Mackman N: The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocyte cells. *J Biol Chem* 277: 32124-32132, 2002
- Guijaro C, Egido J: Transcription factor- κ B (NF- κ B) and renal disease. *Kidney Int* 59: 415-424, 2001
- Guijaro C, Kaene WF: Effects of lipids on the pathogenesis of progressive renal failure: Role of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in the prevention of glomerulosclerosis. *Miner Electrolyte Metab* 22: 147-152, 1996
- Guijarro C, Kim Y, Schoonover CM, Massy CA, O'Donnell MP, Kasiske BL, Keane WF, Kashtan CE: Lovastatin inhibits lipopolysaccharide-induced NF κ B activation in human mesangial cells. *Nephrol Dial Transplant* 11: 990-996, 1996
- Guillemot L, Levy A, Raymondjean M, Rothut B: Angiotensin II-induced transcriptional activation of the cyclin D1 gene is mediated by Egr-1 in CHO-AT (1A) cells. *J Biol Chem* 276: 39394-39403, 2001
- Gupta MP, Gupta M, Zak R, Sukhatme VP: Egr-1, a serum-inducible zinc finger protein, regulates transcription of the rat cardiac alpha-myosin heavy chain gene. *J Biol Chem* 266: 12813-12816, 1991

- Haas CS, Schocklmann HO, Lang S, Kralewski M, Sterzel RB: Regulatory mechanism in glomerular mesangial cell proliferation. *J Nephrol* 12:405-15, 1999
- Hadad SJ, Souza ER, Ferreira AT, Oshiro ME, Boim MA, Razvickas CV, Moura LA, Schor N: FK-506 effects on glomerular hemodynamics and on mesangial cells in culture. *Kidney Int* 48: 56-64, 1995
- Hahn AW, Resink TJ, Scott-Burden T, Powell J, Dohi Y, Buhler FR: Stimulation of endothelin mRNA and secretion in rat vascular smooth muscle cells: a novel autocrine function. *Cell Regul* 1:649-59, 1990
- Hammond TG, Kind CN: Pancreatic and nephrotoxicity of immunomodulator compounds. *Toxicol Lett* 82/83: 99-105, 1995
- Han Y, Runge MS, Brasier AR: Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor-kappa B transcription factors. *Circ Res* 84:695-703, 1999
- Haneda M, Araki S, Sugimoto T, Togawa M, Koya D, Kikkawa R: Differential inhibition of mesangial MAP kinase cascade by cyclic nucleotides. *Kidney Int* 50: 384-391, 1996
- Haneda M, Kikkawa R, Koya D, Shikano T, Sugimoto T, Togawa M, Shigeta Y: Endothelin-1 stimulates tyrosine phosphorylation of p125 focal adhesion kinase in mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 6: 1504-1510, 1995
- Harada K, Ogura T, Yamauchi T, Otsuka F, Mimura Y, Hashimoto M, Oishi T, Makino H: Effect of continuous infusion of vasopressin on glomerular growth response in spontaneously hypertensive rats. *Regul Pept* 74:11-8, 1998
- Hattori Y, Nakanishi N, Kasai K: Statin enhances cytokine-mediated induction of nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 54: 649-658, 2002
- Hausding M, Witteck A, Rodriguez-Pascual F, von Eichel-Streiber C, Forstermann U, Kleinert H: Inhibition of small G proteins and the rho family by statins or clostridium difficile toxin B enhances cytokine-mediated induction of NO synthase II. *Br J Pharmacol* 131: 553-561, 2000
- Hauser IA, Renders L, Radeke HH, Sterzel B, Goppelt-Struebe M: Mycophenolate mofetil inhibits rat and human mesangial cell proliferation by guanosine depletion. *Nephrol Dial Transplant* 14: 58-63, 1999
- Heldin CH, Ostman A, Ronnstrand L: Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochim Biophys Acta* 1378: F79-113, 1998
- Heldin CH, Westermark B, Wasteson A. Platelet-derived growth factor: purification and partial characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 3722-6, 1979
- Heldin CH, Westermark B: Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 79: 1283-1316, 1999
- Heldin CH: Structural and functional studies on platelet-derived growth factor. *Embo J* 11: 4251-4259, 1992
- Helin K, Stoll M, Meffert S, Stroht U, Unger T: The role of angiotensin receptors in cardiovascular disease. *Ann Med* 29: 23-29, 1997
- Helt AM, Funk JO, Galloway DA: Inactivation of both the retinoblastoma tumor suppressor and p21 by human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is necessary to inhibit cell cycle arrest in human epithelial cells. *J Virol* 76: 10559-10568, 2002

Hengst L, Dulic V, Slingerland JM, Lees E, Reed SI: A cell cycle-regulated inhibitor of cyclin-dependent kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5291-5295, 1994

Hengst L, Reed SI: Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. *Science* 271: 1861-1864, 1996

Hernandez-Perera O, Perez-Sala D, Navarro-Antolin J, Sanchez-Pascuala R, Hernandez G, Diaz C, Lamas S: Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 15: 2711-2719, 1998

Herold G: *Innere Medizin*. 2001

Hershman HR: Regulation of prostaglandin-synthase-1 und prostaglandin-synthase-2. *Cancer Metastasis Rev* 13: 241-256, 1994

Hill TD, Dean NM, Mordan LJ, Lau AF, Kanemitsu MY, Boynton AL: Pdgf-induced activation of phospholipase C is not required for induction of DNA synthesis. *Science* 248: 1660-1663, 1990

Hipskind RA, Bilbe G: MAP Kinase Signaling Cascades and Gene Expression in Osteoblasts. *Frontiers in Bioscience* 3: d804-816, 1998

Hirai A, Nakamura S, Noguchi Y, Yasuda T, Kitagawa M, Tatsuno I, Oeda T, Tahara K, Terano T, Narumiya S, Kohn LD, Saito Y: Geranylgeranylated rho small GTPase (s) are essential for the degradation of p27Kip1 and facilitate the progression from G1 to S phase in growth-stimulated rat FRTL-5 cells. *J Biol Chem* 272: 13-16, 1997

Hirschfeld M, Weiss JJ, Toshchakov V, Salkowski CA, Cody MJ, Ward DC, Quereshi N, Michalek SM, Vogel SN: Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists result in differential gene expression in murine macrophages. *Infect Immun* 69: 1477-1482, 2001

Hjoberg J, Le L, Imrich A, Subramaniam V, Mathew SI, Vallone J, Haley KJ, Green FH, Shore SA, Silvermann ES: Induction of early growth-response factor 1 by platelet-derived growth factor in human airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286: L817-825, 2004

Horii Y, Muraguchi A, Iwano M, Matsuda T, Hirayama T, Yamada H, Fujii Y, Dohi K, Ishikawa H, Ohmoto Y, Yoshizaki K, Hirano T, Kishimoto T: Involvement of IL-6 in mesangial proliferative glomerulonephritis. *J Immunol* 143:3949-3955, 1989

Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ: Molecular and cellular mechanism of angiotensin II-mediated apoptosis. *Endocr Res* 24; 307-314, 1998

Horiuchi M, Hayashida W, Kambe T, Yamada T, Dzau VJ: Angiotensin II type 2 receptor dephosphorylates Bcl-2 by activating mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and induces apoptosis. *J Biol Chem* 272: 19022-19026, 1997

Hruby Z, Beck KF: Cytotoxic effect of autocrine and macrophage-derived nitric oxide on cultured rat mesangial cells. *Clin Exp Immunol* 107:76-82, 1997

Hu Q, Klippel A, Muslin AJ, Fantl WJ, Williams LT: Ras-dependent induction of cellular response by constitutively active phosphatidylinositol-3 kinase. *Science* 268: 100-102, 1995

Huang LE, Bunn HF: Hypoxia-inducible factor and its biomedical relevance. *J Biol Chem* 278: 19575-19578, 2003

Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF: Regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via ubiquitin-proteasome-pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7987-92, 1998

- Hughes AK, Padilla E, Kutchera WA, Michael JR, Kohan DE: Endothelin-1 induction of cyclooxygenase-2 expression in rat mesangial cells. *Kidney Int* 47: 53-61, 1995
- 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
- Huwiler A, Wartmann M, van den Bosch, Pfeilschifter J: Extracellular nucleotides activate the p38-stress-activated protein kinase cascade in glomerular mesangial cells. *Br J Pharmacol* 129: 612-618, 2000
- Ichikawa I, Harris RC: Angiotensin actions in the kidney: renewed insight into the old hormone. *Kidney Int* 40: 583-596, 1991
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G: Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 9265-9, 1987
- Ignarro LJ: Haem-dependent activation of guanylate cyclase and cyclic GMP formation by endogenous nitric oxide: a unique transduction mechanism for transcellular signaling. *Pharmacol Toxicol* 67: 1-7, 1990
- Imanishi T, Hano T, Nishio I: Angiotensin II potentiates vascular endothelial growth factor-induced proliferation and network formation of endothelial progenitor cells. *Hypertens Res* 27:101-8, 2004
- Inagaki K, Iwanaga Y, Sarai N, Onozawa Y, Takenaka H, Mochly-Rosen D, Kihara Y: Tissue angiotensin II during progression or ventricular hypertrophy to heart failure in hypertensive rats; differential effects on PKC epsilon and PKC beta. *J Mol Cell Cardiol* 34:1377-85, 2002
- Inagami T, Eguchi S, Numaguchi K, Motley ED, Tang H, Matsumoto T, Yamakawa T: Cross-talk between angiotensin II receptors and the tyrosine kinases and phosphatases. *J Am Soc Nephrol* 10 Suppl 11: S57-61, 1999
- Inoue H, Tanabe T, Umesono K: Feedback control of cyclooxygenase-2 expression through PPARgamma. *J Biol Chem* 275: 28028-28032, 2000
- Ishaque A, Dunn MJ, Sorokin A: Cyclooxygenase-2 inhibits tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis in renal glomerular mesangial cells. *J Biol Chem* 278: 10629-10640, 2003
- Ishikawa S, Kawasumi M, Saito T: Simvastatin inhibits the cellular signaling and proliferative action of arginine vasopressin in cultured rat glomerular mesangial cells. *Endocrinology* 136: 1954-1961, 1995
- Isono M, Haneda M, Maeda S, Omatsu-Kanbe M, Kikkawa R: Atrial natriuretic peptide inhibits endothelin-1-induced activation of JNK in glomerular mesangial cells. *Kidney Int* 53: 1133-1142, 1998
- Itoh H, Mukoyama M, Pratt RE, Gibbons GH, Dzau VJ: Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to angiotensin II. *J Clin Invest* 91: 2268-2274, 1993
- Iwami K, Ashizawa N, Do YS, Graf K, Hsueh WA: Comparison of Ang II with others growth factors on Egr-1 and matrix gene expression in cardiac fibroblast. *Am J Physiol* 270: H2100-2107, 1996
- Jackson SM, Ericsson J, Edwards PA: Signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Subcell biochem* 28: 1-21, 1997
- Jaffer F, Saunders C, Shultz P, Throckmorton D, Weinsell E, Abboud HE: Regulation of mesangial cell growth by polypeptide mitogens. Inhibitory role of transforming growth factor beta. *Am J Pathol* 135: 261-269, 1989

Jaimes EA, Galceran JM, Rajj L: Angiotensin II induces superoxide anion production by mesangial cells. *Kidney Int* 54:775-84, 1998

Japanese FK-506 Study Group: Morphological characteristics of renal allografts showing renal dysfunction under FK-506 therapy: Is graft biopsy available to reveal the morphological findings corresponding with FK-506 nephropathy? *Transplant Proc* 25: 624-630, 1993

Johnson GS and Mukku VR: Evidence in intact cells for an involvement of GTP in the activation of adenylate cyclase. *J Biol Chem* 254: 95-100, 1979

Johnson RJ, Raines EW, Floege J, Yoshimura A, Pritzl P, Alpers C, Ross R: Inhibition of mesangial cell proliferation and matrix expansion in glomerulonephritis in rat by antibody to platelet-derived growth factor. *J Exp Med* 175: 1413-1416, 1992

Johnson RJ: The glomerular response to injury: Progression or resolution? *Kidney Int* 45: 1769-1782, 1994

Jones BW, Heldwin KA, Means TK, Saukkonen JJ, Fenton MJ: Differential roles of Toll-like receptors in the elicitation of proinflammatory responses by macrophages. *Ann Rheum Dis* 60: 6-12, 2001a

Jones BW, Means TK, Heldwin KA, Keen MA, Hill PJ, Belisle JT, Fenton MJ: Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses. *J Leukoc Biol* 69: 106-1044, 2001b

Jonsson CA, Carlsten H: Inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) inhibition in vitro suppresses lymphocyte proliferation and the production of immunoglobulins, autoantibodies and cytokines in splenocytes from MRLlpr/lpr mice. *Clin Exp Immunol* 124:486-91, 2001

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

Kahan BD: Cyclosporin A: a selective anti-T cell agent. *Clin Haematol* 11: 743-761, 1982

Karin M: Signal transduction from the cell surface to the nucleus through the phosphorylation of transcription factors. *Curr Opin Cell Biol* 6:415-24, 1994

Karin M: The Regulation of AP-1 Activity by Mitogen-activated-Protein-Kinases. *J Biol Chem* 270: 16483-16486, 1995

Karin M, Liu Z, Zandi E: AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9: 240-246, 1997

Kawano H, Kim S, Ohta K, Nakao T, Miyazaki H, Nakatani T, Iwao H: Differential contribution of three mitogen-activated protein kinases to PDGF-BB-induced mesangial cell proliferation and gene expression. *J Am Soc Nephrol* 14:584-92, 2003

Kelly DJ, Cox AJ, Gow RM, Zhang Y, Kemp BE, Gilbert RE: Platelet-derived growth factor receptor transactivation mediates the trophic effects of angiotensin II in vivo. *Hypertension* 44: 195-202, 2004

Ketteler M, Border WA, Noble NA: Cytokines and L-arginine in renal injury and repair. *Am J Physiol* 267: F197-207, 1994

Khachigian LM, Collins T: Inducible expression of Egr-1-dependent genes: paradigm of transcriptional activation in vascular endothelium. *Circ Res* 81: 457-461, 1997

Khachigian LM, Fries JW, Benz MW, Bonthron DT, Collins T. Novel cis-acting elements in the human platelet-derived growth factor B-chain core promoter that mediate gene expression in cultured vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 269: 22647-56, 1994

- Khachigian LM, Lindner V, Williams AJ, Collins T. Egr-1-induced endothelial gene expression: a common theme in vascular injury. *Science* 271:1427-31, 1996
- Khachigian LM, Resnick N, Gimbrone MA Jr, Collins T. Nuclear factor-kappa B interacts functionally with the platelet-derived growth factor B-chain shear-stress response element in vascular endothelial cells exposed to fluid shear stress. *J Clin Invest* 96:1169-75, 1995
- Khanna A, Plummer M, Bromberek C, Bresnahan B, Hariharan S: Expression of TGF-beta and fibrogenic genes in transplant recipients with tacrolimus and cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 62: 2257-2263, 2002
- Khanna AK: The immunosuppressive agent tacrolimus induces p21 WAF/CIP1/WAF1/CIP1 via TGF-beta secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 303: 266-272, 2003
- Kharbanda SM, Sherman ML, Kufe DW: Effects of tiazofurin on guanine nucleotide binding regulatory proteins in HL-60 cells. *Blood* 75:583-8, 1990
- Kim SJ, Park K, Rudkin BB, Dey BR, Sporn MB, Roberts AB: Nerve growth factor induces transcription of transforming growth factor-beta 1 through a specific promoter element in PC 12 cells. *J Biol Chem* 269: 3739-3744, 1994
- Kinane TB, Finder JD, Kawashima A, Brown D, Abbate M, Shang C, Fredericks WJ, Rauscher FJ, Sukhatme VP, Ercolani L: Growth of LLC-PK1 renal cells is mediated by Egr-1 up-regulation of G protein alpha i-2 protooncogene transcription. *J Biol Chem* 269: 27503-27509, 1994
- Klein T, Nusing RM, Pfeilschifter J, Ullrich V. Selective inhibition of cyclooxygenase 2. *Biochem Pharmacol* 48:1605-10, 1994
- Kliwer SA, Lenhard JM, Wilson TMI: A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 83: 813-819, 1995
- Kohler N, Lipton A: Platelet as source of fibroblast growth-promoting activity. *Exp Cell Res* 87: 297-301, 1974
- Koibuchi Y, Lee WS, Gibbons GH, Pratt RE: Role of transforming growth factor- β 1 in the cellular growth response to angiotensin II. *Hypertension* 21: 1046-1050, 1993
- Kreisberg JI, Radnik RA, Ayo SH, Garoni J, Saikumar P: High glucose elevates c-fos and c-jun transcripts and proteins in mesangial cell cultures. *Kidney Int* 46: 105-112, 1994
- Kremer S, Margolis B, Harper P, Skorecki K: Cyclosporine induced alteration in vasopressin signalling in the glomerular mesangial cell. *Clin Invest Med* 12: 201-206, 1989
- Kroncke KD, Carlberg C: Inactivation of zinc finger transcription factors provides a mechanism for a gene regulatory role of nitric oxide. *FASEB J* 14: 166-73, 2000
- Kroncke KD, Suschek CV, Kolb-Bachofen V: Implications of inducible nitric oxide synthase expression and enzyme activity. *Antioxid Redox Signal* 2: 585-605, 2000
- Kuhlmann MK, Kohler H: Die RENAAL-Studie. Effekte von Losartan bei diabetischer Nephropathie. *Internist* 43: 675 – 677, 2002
- Kunz D, Muhl H, Walker G, Pfeilschifter J: Two distinct signaling pathways trigger the expression of inducible nitric oxide synthase in rat renal mesangial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 5387-91, 1994

- Kunz D, Walker G, Pfeilschifter J: Transforming growth factor-beta 2 inhibits interleukin 1 beta-induced expression of inducible nitric oxide synthase in rat renal mesangial cells. *Inflamm Res* 46: 327-31, 1997
- Kunz DG, Walker G, Pfeilschifter J: Dexamethasone differentially affects interleukin 1 β and cAMP-induced nitric oxide synthase expression in rat mesangial cells. *Biochem J* 304: 3337-3340, 1994
- Lämmlli UK: Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970
- Lander HM, Jacovina AT, Davis RJ, Tauras JM: Differential activation of mitogen-activated protein kinases by nitric oxide-related species. *J Biol Chem* 271: 19705-9, 1996
- Lander HM, Ogiste JS, Pearce SF, Levi R, Novogrodsky A: Nitric oxide-stimulated guanine nucleotide exchange on p21ras. *J Biol Chem* 270: 7017-20, 1995
- Lander HM, Sehajpal P, Levine DM, Novogrodsky A: Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nitric oxide-generating compounds. *J Immunol* 150: 1509-16, 1993
- Laurent M, Lepoivre M, Tenu JP: Kinetic modelling of the nitric oxide gradient generated in vitro by adherent cells expressing inducible nitric oxide synthase. *Biochem J* 314: 109-13, 1996 2
- Lea JP, Jin SG, Roberts BR, Shuler MS, Marrero MB, Tumlin JA: Angiotensin II stimulates calcineurin activity in proximal tubule epithelia through AT-1 receptor-mediated tyrosine phosphorylation of the PLC-gamma1 isoform. *J Am Soc Nephrol* 13:1750-6, 2002
- Lee CG, Cho SJ, Kang MJ, Chapoval SP, Lee PJ, Noble PW, Yehualaeshet T, Lu B, Flavell RA, Milbrandt J, Homer RJ, Elias JA: Early growth response gene 1-mediated apoptosis is essential for transforming growth factor- β 1-induced pulmonary fibrosis. *J Exp Med* 200: 377-389, 2004
- Lee TM, Su SF, Tsai CH: Effect of pravastatin on proteinuria in patients with well-controlled hypertension. *Hypertension* 40: 67-73, 2002
- Leehey DJ, Singh AK, Alavi N, Singh R: Role of angiotensin II in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl.* 77: S93-S98, 2000
- Leitschuh M, Chobanian AV: Inhibition of nuclear polyploidy by propranolol in aortic smooth muscle cells of hypertensive rats. *Hypertension* 9 Suppl III: 106-109, 1987
- Lemaire P, Vesque C, Schmitt J, Stunnenberg H, Frank R, Charnay P: The serum-inducible mouse gene Krox-24 encodes a sequence specific transcriptional activator. *Molec Cell Biol* 10: 3456-3467, 1990
- Li H, Yin H, Zhang H, Wang Z, She M: [Activation of NF-kappa B and its effect on induction of platelet-derived growth factor-B transcription by angiotensin II in ECV304 cell line]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 30:276-80, 2001
- Li J, Zhang X, Sejas DP, Bagby GC, Pang Q: Hypoxia-induced nucleophosmin protects cell death through inhibition of p53. *J Biol Chem* 279: 41275-41279, 2004
- Liang Y, Robinson DF, Dennig J, Suske G, Fahl WE. Transcriptional regulation of the SIS/PDGF-B gene in human osteosarcoma cells by the Sp family of transcription factors. *J Biol Chem* May 271:11792-7, 1996
- Liao DF, Duff JL, Daum G, Pelech SL, Berk BC: Angiotensin II stimulates MAP kinase kinase kinase activity in vascular smooth muscle cells. Role of Raf. *Circ Res* 79: 1007-1014, 1996

- Libby P, Warner SJ, Friedman GB. Interleukin 1: a mitogen for human vascular smooth muscle cells that induces the release of growth-inhibitory prostanoids. *J Clin Invest* 81:487-98, 1988
- Ling H, Vamvakas S, Schaefer L, Schnittler HJ, Schaefer RM, Heidland A.: Angiotensin-II-induced cell hypertrophy: potential role of impaired proteolytic activity in cultured LLC-PK1 cells. *Nephrol Dial Transplant* 10: 1305-1312, 1995
- Liu C, Adamson E, Mercola D: Transcription factor Egr-1 suppresses the growth and transformation of human HAT-1080 fibrosarcoma cells by induction of transforming growth factor beta 1. *Proc Natl acad Sci* 93: 11831-11836, 1996
- Liu C, Rangnekar VW, Adamson E, Mercola D: Suppression of growth and transformation and induction of apoptosis by Egr-1. *Cancer Gene Ther* 5: 3-28, 1998
- Liu J, Albers MW, Wandless TJ, Luan S, Alberg DG, Belshaw PJ, Cohen P, MacKintosh C, Klee CB, Schreiber SL: Inhibition of T-cell signalling by immunophilin-ligand complexes correlates with loss of calcineurin phosphatase activity. *Biochemistry* 31, 3896, 1992
- Liu J, Farmer JD, Jr., Lane WS, Friedmann J, Weissmann I, Schreiber SL: Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK-506 complexes. *Cell* 66: 807, 1991
- Liu J: FK-506 and cyclosporin, molecular probes for studying intracellular signal transduction. *Immunology Today* 14: 290, 1993
- Lüscher TF: Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *J Myocard Ischemia* 7: 15-20, 1995
- Marrero MB, Schieffer B, Bernstein KE, Ling BN: Angiotensin II-induced phosphorylation in mesangial and vascular smooth muscle cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 23: 83-88, 1996
- Marrero MB, Schieffer B, Li B, Sun J, Harp JB, Ling BN: Role of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription and mitogen-activated protein kinase cascades in angiotensin II- and platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem* 272: 24684-24690, 1997
- Marrero MB, Schieffer B, Paxton WG, Heerdt L, Berk BC, Delafontaine P, Bernstein KE: Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. *Nature* 375: 247-250, 1995
- Martin E, Nathan C, Xie QW, Beatrice and Samuel A: Role of interferon regulatory factor 1 in induction of nitric oxide synthase. *J Exp Med* 180: 977-84, 1994
- Martin M, Krichbaum M, Kaefer V, Goppelt-Strübe M, Resch K: Cyclosporin A suppress proliferation of renal mesangial cells in culture. *Boichem Pharmacol* 37, 1083, 1988
- Martin M, Neumann D, Hoff T, Resch K, DeWitt DL, Goppelt-Struebe M: Interleukin-1-induced cyclooxygenase 2 expression is suppressed by cyclosporin A in rat mesangial cells. *Kidney Int* 45: 150-158, 1994a
- Martin MM, Su B, Elton TS: Molecular cloning of the human angiotensin II type 2 receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 204: 645-651, 1994b
- Martin R: Elektrophorese von Nucleinsäuren. 1996 Spektrum Akademischer Verlag, Heideberg, Berlin, Oxford
- Masaki H, Kurihara T, Yamaki A, Inomata N, Nozawa Y, Mori Y, Murasawa S, Kizima K, Maruyama K, Horiuchi M, Dzau VJ, Takahashi H, Iwasaka T, Inada M, Matsubara H: Cardiac-specific overexpression of angiotensin II AT2 receptor causes attenuated response to AT1 receptor-mediated pressor and chronotropic effects. *J Clin Invest* 101: 527-535, 1998

- Maschio G, Alberti D, Janin G, Locatelli F, Mann JFE, Motolese M, Ponticelli C, Ritz E, Zucchitelli P: Effect of angiotensin converting enzyme inhibitor benazepril on the progression of chronic renal insufficiency. *N Engl J Med* 334: 939-943, 1996
- Massy ZA, Guijarro C, Oda H, Kasiske BL, Keane WF, O'Donnell MP: Importance of geranylgeranyl pyrophosphate for mesangial cell DNA synthesis. *Kidney Int* 56: S80-83, 1999
- Matthews JR, Botting CH, Panico M, Morris HR, Hay RT: Inhibition of NF-kappaB DNA binding by nitric oxide. *Nucleic Acids Res* 24: 2236-42, 1996
- McCauley J, Studer R, Craven P, Murray S: The effects of cyclosporine A, cyclosporine G, and FK-506 upon prostaglandin production in renal mesangial cells in culture. *Transplant Proc* 23: 3141-3142, 1991
- McKay S, de Jongste JC, Saxena PR, Sharma HS: Angiotensin II induces hypertrophy of human airway smooth muscle cells: expression of transcription factors and transforming growth factor- β 1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18: 823-833, 1998
- Meffert S, Stoll M, Steckelings UM, Bottari SP, Unger T: The Angiotensin II AT2 receptor inhibits proliferation and promotes differentiation in PC12W cells. *Mol Cell Endocrinol* 122: 59-67, 1996
- 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
- Mene P, Simonson S, Dunn MJ: Physiology of the mesangial cell. *Physiol Rev* 69: 1347-1424, 1989
- Menzies K, Liu B, Kim WJ, Moschella MC, Taubman MB: Regulation of the SM-20 prolyl hydroxylase gene in smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 317: 801-810, 2004
- Messmer UK, Ankarcona M, Nicotera P, Brune B: p53 expression in nitric oxide-induced apoptosis. *FEBS Lett* 355: 23-6, 1994
- Messmer UK, Brune B: Nitric oxide-induced apoptosis: p53-dependent and p53-independent signalling pathways. *Biochem J* 319: 299-305, 1996
- Mezzano SA, Barria M, Droguett MA, Burgos ME, Ardiles LG, Flores C, Egido J: Tubular NF-kappaB and AP-1 activation in human proteinuric renal disease. *Kidney Int* 60: 1366-1377, 2001
- Milano S, Arcoleo F, Dieli M, D'Agostino R, D'Agostino P, De Nucci G, Cillari E: Prostaglandin E2 regulates inducible nitric oxide synthase in the murine macrophage cell line J774. *Prostaglandins* 49: 105-15, 1995
- Mohacs PJ, Tuller D, Hulliger B, Wijngaard PL: Different inhibitory effects of immunosuppressive drugs on human and rat smooth muscle and endothelial cell proliferation stimulated by platelet-derived growth factor or endothelial cell growth factor. *J Heart Lung Transplant* 16: 484-492, 1997
- Mohr S, Stamler JS, Brune B: Mechanism of covalent modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase at its active site thiol by nitric oxide, peroxynitrite and related nitrosating agents. *FEBS Lett* 348: 223-7, 1994
- 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
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA: Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142, 1991

Moro MA, Darley-Usmar VM, Goodwin DA, Read NG, Zamora-Pino R, Feelisch M, Radomski MW, Moncada S: Paradoxical fate and biological action of peroxynitrite on human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 6702-6, 1994

Moschella MC, Menzies K, Tsao L, Lieb MA, Kotz JD, Kotz DS, Taubmann: SM-20 is a novel growth factor-responsive gene regulated during skeletal muscle development and differentiation. *Gene Expr* 8: 59-66, 1999

Mosley K, Collar J, Cattell V: Mesangial cell necrosis in Thy 1 glomerulonephritis--an ultrastructural study. *Virchows Arch* 436: 567-73, 2000

Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63, 1983

Mueck AO, Seeger H, Lippert TH: Valsartan inhibits angiotensin II-stimulated proliferation of smooth muscle cells from human coronary artery. *Int J Clin Pharmacol Ther* 37: 365-366, 1999

Mühl H, Kunz D, Pfeilschifter J: Expression of nitric oxide synthase in rat glomerular mesangial cells mediated by cyclic AMP. *Br J Pharmacol* 112: 1-8, 1994

Mühl H, Pfeilschifter J: Amplification of nitric oxide synthase expression by nitric oxide in interleukin 1 β -stimulated rat mesangial cells. *J Clin Invest* 95: 1941-1946, 1995

Mühl H, Sandau K, Brüne B, Briner VA, Pfeilschifter J: Nitric oxide donors induce apoptosis in glomerular mesangial cells, epithelial cells and endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 317: 137-49, 1996

Mullis KB, Faloona FA: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-50, 1987

Mundschau LJ, Forman LW, Wenig H, Fallers DF: Platelet-derived growth factor (PDGF) induction of *egr-1* is independent of PDGF receptor autophosphorylation on tyrosine. *J Biol Chem* 269: 16137-16142, 1994

Muracka K, Fujimoto K, Sun X, Yoshicka K, Shimizu K, Yagi M, Bose H, Miyazaki I, Yamamoto K: Immunosuppressant FK-506 induces interleukin-6 production through the activation of transcription factor nuclear factor (NF)- κ B. *J Clin Invest* 97:2433-2439, 1996

Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, Bernstein KE: Isolation of cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* 351: 233-236, 1991

Muscella A, Greco S, Elia MG, Storelli C, Marsigliante S: PKC-zeta is required for angiotensin II-induced activation of ERK and synthesis of C-FOS in MCF-7 cells. *J Cell Physiol* 197:61-8, 2003

Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, Hayashida W, Morishita R, Zhang L, Horiuchi M, Pratt RE, Dzau VJ: The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:10663-7, 1995

Nalesnik MA, Todo S, Murase N, Gryzan S, Lee P-H, Makowka L, Starzel TE: Toxicology of FK-506 in the Lewis rat. *Transplant Proc* 19: 89-92, 1987

Nathan C, Xie Q: Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 269: 13725-13728, 1994

Nicolson AG, Haites NE, McKay NG, Wilson HM, MacLeod AM, Benjamin N: Induction of nitric oxide synthase in human mesangial cells. *Biochem Biophys Res Comm* 193: 1269-1274, 1993

Niculescu AB, Chen X, Smeets M, Hengst L, Prives C, Reed SI: Effects of p21(CIP1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and preventing endoreduplication. *Mol Cell Biol* 18: 629-643, 1998

Niemir ZI, Stein H, Noronha IL, Kruger C, Andrassy K, Ritz E, Waldherr R: PDGF and TGF- β contribute to the natural course of human IgA glomerulonephritis. *Kidney Int* 48: 1530-1541, 1995

Niketic V, Stojanovic S, Nikolic A, Spasic M, Michelson AM: Exposure of Mn and FeSODs, but not Cu/ZnSOD, to NO leads to nitrosonium and nitroxyl ions generation which cause enzyme modification and inactivation: an in vitro study. *Free Radic Biol Med* 27: 992-6, 1999

Nishimura J, Kobayashi S, Shikasho T, Kanaide H: Platelet derived growth factor induces c-fos and c-myc mRNA in rat aortic smooth muscle cells in primary culture without elevation of intracellular Ca²⁺ concentration. *Biochem Biophys Res Commun* 188: 1198-1204, 1992

Nitsch DD, Ghilardi N, Muhl H, Nitsch C, Brune B, Pfeilschifter J: Apoptosis and expression of inducible nitric oxide synthase are mutually exclusive in renal mesangial cells. *Am J Pathol* 150: 889-900, 1997

Nogaki F, Muso E, Yashiro M, Kasuno K, Kamata T, Ono T, Sasayama S: Direct inhibitory effects of simvastatin on matrix accumulation in cultured murine mesangial cells. *Kidney Int Suppl* 71: S198-201, 1999

O'Donnel MP, Kasiske BL, Kim Y, Atluru D, Keane WF: Lovastatin inhibits proliferation of rat mesangial cells. *J Clin Invest* 91: 83-87, 1993a

O'Donnel MP, Kasiske BL, Kim Y, Atluru D, Keane WF: The mevalonate pathway: importance in cell biology and glomerular disease. *Miner Electrolyte Metab* 19: 173-179, 1993b

O'Keefe SJ, Tamura J, Kincaud RL, Tocci MJ, O'Neil EA: FK-506 and CsA-sensitive activation of interleukin-2 promoter by calcineurin. *Nature* 357: 692, 1992

Oda H, Kasiske BL, O'Donnell MP, Keane WF: Effects of lovastatin on expression of cell cycle regulatory proteins in vascular smooth muscle cells. *Kidney Int Suppl* 71: S202-205, 1999

Olah E, Kote Z, Natsumeda Y, Yamaji Y, Jarai G, Lapis E, Financsek I, Weber G: Down-regulation of c-myc and c-Ha-ras gene expression by tiazofurin in rat hepatoma cells. *Cancer Biochem Biophys* 11:107-17, 1990

Olah E, Natsumeda Y, Ikegami T, Kote Z, Horanyi M, Szelenyi J, Paulik E, Kremmer T, Hollan SR, Sugar J, et al.: Induction of erythroid differentiation and modulation of gene expression by tiazofurin in K-562 leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 6533-7, 1988

Ophascharoensuk V, Fero ML, Hughes J, Roberts JM, Shankland SJ: The cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 safeguards against inflammatory injury. *Nat Med* 4: 575-580, 1998

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

Ostendorf T, Kunter U, Grone HJ, Bahlmann F, Kawachi H, Shimizu F, Koch KM, Janjic N, Floege J: Specific antagonism of PDGF prevents renal scarring in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 12: 909-918, 2001

Owens GK: Differential effects of antihypertensive drug therapy on vascular smooth muscle cell hypertrophy, hyperploidy, and hyperplasia in the spontaneously hypertensive rat. *Circ Res* 56: 525-536, 1985

Padgett CM, Whorton AR: S-nitrosoglutathione reversibly inhibits GAPDH by S-nitrosylation. *Am J Physiol* 269: C739-49, 1995

Page IH: Hypertension reseach. A Memoir 1920-1960. *Hypertension* 16: 199-200, 1990

Page LA, Robitaille GA, Pouyssegur J, Richard DE: Induction of hypoxia-inducible factor-1 alpha by transcriptional and translational mechanism. *J Biol Chem* 277: 48403-48409, 2002

Park J, Ha H, Seo J, Kim MS, Kim HJ, Huh KH, Park K, Kim YS: Mycophenolic acid inhibits platelet-derived growth factor-induced reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase activation in rat vascular smooth muscle cells. *Am J Transplant* 4: 1982-1990, 2004

Pavletich NP, Pabo CO: Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a zif268-DNA complex at 2,1 Å. *Science Wash DC* 252: 809-817, 1991

Peng HB, Rajavashisth TB, Libby P, Liao JK: Nitric oxide inhibits macrophage-colony stimulating factor gene transcription in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 270: 17050-5, 1995

Perico N, Benigni A, Zoja C, Delaini F, Remuzzi G: Functional significance of exaggerated renal thromboxane A2 synthesis induced by cyclosporin A. *Am J Physiol* 251: F 81-87, 1986

Perico N, Zoja C, Benigni A, Ghilardi F, Gualandris L, Remuzzi G: Effect of short-term cyclosporine administration in rats on renin-angiotensin and thromboxane A2: possible relevance to the reduction in glomerular filtration rate. *J Pharmacol Exp Ther* 239: 229-235, 1986

Pfeilschifter J, Schwarzenbach H: Interleukin 1 and tumor necrosis factor stimulate cGMP formation in rat renal mesangial cells. *FEBS Lett.* 29: 15-187, 1990

Pfeilschifter J und Vosbeck K : Transforming growth factor β inhibits interleukin 1β - and tumour necrosis factor α -induction of nitric oxide synthase in rat renal mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 175: 372-379, 1991

Pfeilschifter J, Huwiler A: Nitric oxide stimulates stress-activated protein kinases in glomerular endothelial and mesangial cells. *FEBS Lett* 396: 67-70, 1996

Pfeilschifter J, Kunz D, Muhl H: Nitric oxide: an inflammatory mediator of glomerular mesangial cells. *Nephron* 64: 518-25, 1993

Pfeilschifter J: Cross-talk between transmembrane signalling systems: a prerequisite for the delicate regulation of glomerular haemodynamics by mesangial cells. *Eur J Clin Invest* 19: 347-361, 1989

Pfeilschifter J: Cyclosporine A augments vasoconstrictor-induced rise in intracellular free calcium in rat renal mesangial cells. *Biochem Pharmacology* 37: 4205, 1988

Pfutzmann R, Klupp J, Langrehr JM, Uhl M, Neuhaus R, Settmacher U, Steinmuller T, Neuhaus P: Mycophenolate mofetil for immunosuppression after liver transplantation: a follow up study of 191 patients. *Transplantation* 76: 130-136, 2003

Pichler R, Huber K: Das Renin-Angiotensin-System und dessen pharmakologische Beeinflussung durch Angiotensin II-Rezeptorblocker bei kardiovaskulären und renalen Erkrankungen. *J Kardiologie* 5:515-529, 1998

Pines A, Romanello M, Cesaratto L, Damante G, Moro L, D'Andrea P, Tell G: Extracellular ATP stimulates the early growth response protein 1 (Egr-1) via a protein kinase C-dependent pathway in the human osteoblastic HOBIT cell line. *Biochem J* 373: 815-824, 2003

Plum J, Bunten B, Nemeth R, Grabensee B: Effects of the angiotensin II antagonist valsartan on blood pressure, proteinuria, and renal hemodynamics in patients with chronic renal failure and hypertension. *J Am Soc Nephrol* 9: 2223-34, 1998

Plum J, Bunten R, Nehmet R, Grabensee B: Treatment with the Angiotensin II antagonist valsartan in patients with chronic renal failure and hypertension. *Nephrol Dial Transplant* 14 Suppl 4: 25-2, 1999

- Quesney-Huneeus V, Wiley MH, Siperstein MD: Essential role for mevalonate synthesis in DNA replication. *Proc Natl Acad sci USA* 76: 5056-5060, 1979
- Radeke HH, Kuster S, Kaever V, Resch K: Effects of cyclosporin and FK-506 on glomerular mesangial cells. *Eur J Clin Pharmacol* 44: S11-S16, 1993
- Rafty LA, Khachigian LM: Zinc finger transcription factors mediate high constitutive platelet-derived growth factor-B expression in smooth muscle cells derived from aortae of newborn rats. *J Biol Chem* 273:5758-64, 1998
- Regazzi MB, Rinaldi M, Molinaro M, Pellegrini C, Calvi M, Arbustini E, Bellotti E, Bascapè V, Martinelli L, Vigano M: Clinical pharmacokinetics of tacrolimus in heart transplantant recipients. *Ther Drug Monit* 21: 2-7, 1999
- Renders L, Jahrestagung der DTG 1997: 110 Abstr. P-33
- Richard DE, Berra E, Pouyssegur J: Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1 alpha in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 275: 26765-26771. 2000
- Riley DJ, Lee EY-HP, Lee W-H: The retinoblastoma protein: more than a tumor suppressor. *Anu Rev Cell Biol* 10: 1-29, 1994
- Rosen S, Greenfeld Z, Brezis M: Chronic cyclosporin-induced nephropathy in the rat. *Transplantation* 49: 445-452, 1990
- Ross R, Glomset J, Kariya B, Harker L: A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71: 1207-10, 1974
- Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF: The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 46: 155-169, 1986
- Ruggenti P: The REIN follow up-Study. *Lancet* 352: 1252-1256, 1998
- Rupprecht 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
- Rupprecht HD, Dann P, Sukhatme VP, Sterzel RB, Coleman DL: Effect of induction of Egr-1 in rat mesangial cells: Correlation with mitogenicity. *Am J Physiol* 263: F623-F636, 1992a
- Rupprecht 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: F623-636, 1992b
- Rupprecht HD, Hofer G, De Heer E, Sterzel RB, Faller G, Schoecklmann HO: Expression of the transcriptional regulator Egr-1 in experimental glomerulonephritis: Requirement for mesangial cell proliferation. *Kidney Int* 51: 694-702, 1997
- Rupprecht HD, Sukhatme HD, Lacy J, Sterzel RB, Coleman DL: PDGF-induced Egr-1 expression in rat mesangial cells is mediated through upstream serum response elements. *Am Physiol* 265: F351-F360, 1993
- Rzymkiewicz D, Leingang K, Baird N, Morrison AR: Regulation of prostaglandin endoperoxide synthase gene expression in rat mesangial cells by interleukin-1 beta. *Am J Physiol* 266: F39-45, 1994
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-4, 1985

- Saito Y, Berk BC: Transactivation: a novel signaling pathway from angiotensin II to tyrosine kinase receptors. *J Mol Cell Cardiol* 33: 3-7, 2001
- Sandau K, Pfeilschifter J, Brune B: Nitric oxide and superoxide induced p53 and Bax accumulation during mesangial cell apoptosis. *Kidney Int* 52: 378-86, 1997 a
- Sandau K, Pfeilschifter J, Brune B: The balance between nitric oxide and superoxide determines apoptotic and necrotic death of rat mesangial cells. *J Immunol* 158: 4938-46, 1997 b
- Savoldi S, Kahan BD: Relationship of cyclosporine pharmacokinetic parameters to clinical events in human renal transplantation. *Transplant Proc* 18: 120-8, 1986
- Sawano H, Haneda M, Sugimoto T, Inoki K, Koya D, Kikkawa R: 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J_2 inhibits IL-1 β -induced cyclooxygenase-2 expression in mesangial cells. *Kidney Int* 61: 1957-1967, 2002
- Saward L, Zahradka P: Angiotensin II activates phosphatidylinositol 3-kinase in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 81: 249-257, 1997
- 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
- Schäfer H, Zheng J, Gundlach F, Günther R, Schmidt WE: PACAP stimulates transcription of c-fos and c-jun and activates the AP-1 transcription factor in rat pancreatic carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 221: 111-116, 1996
- Schafer WR, Kim R, Sterne R, Thorner J, Kim SH, Rine J: Genetic and pharmacological suppression of oncogenic mutations in ras genes of human and yeast. *Science* 245: 379-385, 1989
- Scharnhorst V, Menke AL, Attema J, Haneveld JK, Riteco N, van Steenbrugge GJ, van der Eb AJ, Jochemsen AG: EGR-1 enhances tumor growth and modulates the effect of the Wilms' tumor 1 gene products on tumorigenicity. *Oncogene* 19: 791-800, 2000
- Scharschmidt LA, Dunn MJ: Prostaglandin synthesis by rat glomerular mesangial cells in culture. Effects of angiotensin II and arginine vasopressin. *J Clin Invest* 71:1756-64, 1983
- Schmidt HH, Lohmann SM, Walter U: The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* 1178: 153-75, 1993
- Schnitzer-Polokoff R, von Gunten C, Logel J, Torget R, Sinensky M: Isolation and characterisation of a mammalian cell mutant defective in 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase. *J Biol Chem* 257:472-476, 1982
- Schönbeck U, Sukhova GK, Graber P, Coulter S, Libby P: Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 155:1281-91, 1999
- Schorb W, Booz GW, Dostal DE, Conrad KM, Chang KC, Baker KM: Angiotensin II is mitogenic in neonatal rat cardiac fibroblasts. *Circ Res* 72: 1245-1254, 1993
- Schrör K, Seidel H: Blood-vessel wall arachidonate metabolism and its pharmacological modification in a new in vitro assay system. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 337: 177-182, 1988
- Schulze-Lohoff E, Kohler M, Fees H, Reindl N, Sterzel RB: Divergent effects of arginine vasopressin and angiotensin II on proliferation and expression of the immediate early genes c-fos, c-jun and Egr-1 in cultured rat glomerular cells. *J Hypertens* 11: 127-134, 1993

Seasholtz TM, Zhang T, Morissette MR, Howes AL, Yang AH, Brown JH: Increased expression and activity of RhoA are associated with increased DNA synthesis and reduced p27(Kip1) expression in the vasculature of hypertensive rats. *Circ Res* 89: 488-495, 2001

Sechi LA, Grady EF, Griffin CA, Kalinyak JE, Schambelan M: Distribution of angiotensin II receptor subtypes in rat and human kidney. *Am J Physiol* 262: F236-240, 1992

Sen CK, Packer L: Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J* 10: 709-20, 1996, Comment in: *FASEB J* 11: 374-5, 1997

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* (82):64-67, 2002

Shankland S, Wolf G: Cell cycle regulatory proteins in renal disease: role in hypertrophy, proliferation, and apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 278: F515-F529, 2000

Shapiro R, Jordan M, Fung J, McCauley, Johnston J, Iwaki Y, Tzakis A, Hakala T, Todo S, Starzl TE: Kidney transplantation under FK-506 immunosuppression. *Transplant Proc* 23: 920-923, 1993

Sheffler LA, Wink DA, Melillo G, Cox GW: Exogenous nitric oxide regulates IFN-gamma plus lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase expression in mouse macrophages. *J Immunol* 155: 886-94, 1995

Sherr CJ: D-type cyclins. *Trends Biochem Sci* 20: 187-190, 1995

Sherr CJ: G1 phase progression: cyclin on cue. *Cell* 79:551-555, 1994

Shihab FS, Bennett WM, Yi H, Choi SO, Andoh TF: Mycophenolate mofetil ameliorates arteriopathy and decreases transforming growth factor- β 1 in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Am J Transplant* 3: 1550-1559, 2003

Shultz PJ, DiCorleto PE, Silver BJ, Abboud HE: Mesangial cells express PDGF mRNA and proliferate in response to PDGF. *Am J Physiol* 255 (Renal Fluid Electrolyte Physiol 24): F674-F684, 1988

Silver BJ, Jaffer FE, Abboud HE: Platelet-derived growth factor synthesis in mesangial cells: induction by multiple peptide mitogens. *Proc Natl acad Sci USA* 86: 1056-1060, 1989

Silverman ES, Collins T: Pathways of Egr-1-mediated gene transcription in vascular biology. *Am J Pathol* 154: 665-670, 1999

Simonson MS, Dunn MJ: Renal actions of endothelin peptides. *Curr Opin Nephrol Hypertension* 2: 51-60, 1993

Sinensky M, Lutz RL: The prenylation of proteins. *Bioessays* 14: 25-31, 1992

Skorecki KL, Rutledge WP, Schrier RW: Acute cyclosporin nephrotoxicity prototype for a renal membrane signalling disorder. *Kidney Int* 42:1, 1992

So HS, Park RK, Kim MS, Lee SR, Jung BH, Chung SY, Jun CD, Chung HAT: Nitric oxide inhibits c-Jun N-terminal kinase 2 (JNK2) via S-nitrosylation. *Biochem Biophys Res Commun* 247: 809-13, 1998

Sodhi CP, Phadke Sa, Battle D, Sahai A: Hypoxia and high glucose cause exaggerated mesangial cell growth and collagen synthesis: role of osteopontin. *Am J Physiol Renal Physiol* 280: F667-674, 2001

Solow BT, Derrien A, Smith JA, Jarett L, Harada S. Angiotensin II inhibits insulin-induced egr-1 expression in mesangial cells. *Arch Biochem Biophys* 370:308-13, 1999

- Spiecker M, Peng HB, Liao JK: Inhibition of endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression by nitric oxide involves the induction and nuclear translocation of I κ B α . *J Biol Chem* 272: 30969-74, 1997
- Stamler JS: Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 78: 931-6, 1994
- Stockand JD, Sansom SC: Large Ca²⁺ activated K⁺ channels responsive to angiotensin II in cultured human mesangial cells. *Am J Physiol* 267: C1080-1086, 1994
- Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T: The angiotensin AT₂-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest* 95: 651-7, 1995
- Stroebel M, Goppelt-Struebe M: Signal transduction pathways responsible for serotonin-mediated prostaglandin G/H synthase expression in rat mesangial cells. *J Biol Chem* 269: 22952-22957, 1994
- Stubauer G, Giuffre A, Sarti P. Mechanism of S-nitrosothiol formation and degradation mediated by copper ions. *J Biol Chem* 274: 28128-33, 1999
- Studer RK, DeRubertis FR, Craven PA: Nitric oxide suppresses increases in mesangial cell protein kinase C, transforming growth factor beta, and fibronectin synthesis induced by thromboxane. *J Am Soc Nephrol* 7: 999-1005, 1996
- Subbaramaiah K, Lin DT, Hart JC, et al: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands suppress the transcriptional activation of cyclooxygenase-2. Evidence for involvement of activator protein-1 and CREB-binding protein/p300. *J Biol Chem* 276:12440-12448, 2001
- Suematsu S, Matsuda T, Aozaka K, Akira S, Nakano N, Ohno S, Miyazaki J, Yamamura K, Hirano T, Kishimoto T: IgG1 plasmacytosis in interleukin 6 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 7547-7551, 1989
- Sugimoto T, Haneda M, Sawano H, Isshiki K, Maeda S, Koya D, Inoki K, Yasuda H, Kashiwagi A, Kikkawa R: Endothelin-1 induces cyclooxygenase-2 expression via nuclear factor of activated T-cell transcription factor in glomerular mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 12: 1359-1368, 2001
- Sugimoto T, Kikkawa R, Haneda M, Shigeta Y: Atrial natriuretic peptide inhibits endothelin-1-induced activation of mitogen-activated protein kinase in cultured rat mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 195: 72-78, 1993
- 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
- Sukhatme VP, Cao X, Chang LL, Tsai-Morris CH, Stamenkovich D, Ferreira PCP, Cohen DR, Edwards SA, Shows TB, Curran T, Le Beau MM, Adamson ED: A zinc-finger encoding gene coregulated with c-Fos during growth and differentiation and after depolarization. *Cell* 53: 37-43, 1988
- Sun BK, Li C, Lim SW, Choi BS, Lee SH, Kim IS, Kim YS, Bang BK, Yang CW: Blockade of Angiotensin II with Losartan Attenuates Transforming Growth Factor-beta1 Inducible Gene-h3 (betaig-h3) Expression in a Model of Chronic Cyclosporine Nephrotoxicity. *Nephron Exp* 99:e9-e16, 2005
- Szabo C, Zingarelli B, O'Connor M, Salzman AL: DNA strand breakage, activation of poly (ADP-ribose) synthetase, and cellular energy depletion are involved in the cytotoxicity of macrophages and smooth muscle cells exposed to peroxynitrite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 1753-8, 1996
- Tabuchi A, Sano K, Oh E, Tsuchiya T, Tsuda M: Modulation of AP-1 activity by nitric oxide (NO) in vitro: NO-mediated modulation of AP-1. *FEBS Lett* 351: 123-7, 1994
- Takai Y, Sasaki T, Matozaki T: Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81: 153-208, 2001

- Takemura T, Okada M, Akano N, Murakami K, Hino S, Yagi K, Takekoshi Y, Yoshoka K: Proto-oncogene expression in human glomerular diseases. *J Pathol* 178: 343-351, 1996
- Terada Y, Tomita K, Nonoguchi H, Marumo F: PCR localisation of angiotensin II receptor and angiotensinogen mRNAs in rat kidney. *Kidney Int* 43: 1251-1259, 1993
- Tetsuka T, Daphna-Iken D, Miller BW, Guan Z, Baier LD, Morrison AR: Nitric oxide amplifies interleukin 1-induced cyclooxygenase-2 expression in rat mesangial cells. *J Clin Invest* 97: 2051-6, 1996
- Tetsuka T, Daphna-Iken D, Srivastava SK, Baier LD, DuMaine J, Morrison AR: Cross-talk between cyclooxygenase and nitric oxide pathways: prostaglandin E2 negatively modulates induction of nitric oxide synthase by interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 12168-72, 1994
- The GISEN Group: The REIN Study. *Lancet* 349: 1857-18-63, 1997
- The HOPE-Study Investigators: The HOPE Study. *N Engl J Med* 145-153, 2000
- Timmermans PB, Carini DJ, Chiu AT, Duncia JV, Price WA Jr, Wells CJ, Wong PC, Wexler RR, Johnson AL: Angiotensin II receptor antagonists. From discovery to antihypertensive drugs. *Hypertension* 18 (Suppl III): 136-142, 1991
- Togawa M, Haneda M, Araki S, Sugimoto T, Isono M, Hidaka H, Yasuda H, Kashiwagi A, Kikkawa R: Bearprost sodium, an analogue of prostacyclin, induces the expression of mitogen activated protein kinase phosphatase and inhibits the proliferation of cultured mesangial cells. *Eur J Pharmacol* 336: 291-294, 1997
- Toshchakov V, Jones BW, Parera PY, Thomas K, Cody MJ, Zhang S, Williams BR, Major J, Hamilton TA, Fenton MJ, Vogel SN: TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages. *Nat Immunol* 3: 392-398, 2002
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Nat Acad Sci* 76: 4350-4354, 1979
- Toyda M, Suzuki D, Honma M, Uehara G, Sakai T, Umezono T, Sakai H: High expression of PKC-MAPK pathway mRNAs correlates with glomerular lesions in human diabetic nephropathy. *Kidney Int* 66: 1107-1114, 2004
- Unger T, Chung O, Csikos T, Culman J, Gallinat S, Gohlke P, Hohle S, Meffert S, Stoll M, Stroth U, Zhu YZ: Angiotensin receptors. *J Hypertens Suppl* 14:S95-103, 1996
- Urata H, Boehm KD, Philip A, Kinoshita A, Gabrovsek J, Bumpus FM, Husain A: Cellular localization and regional distribution of an angiotensin II-forming chymase in the heart. *Clin Invest* 91: 1269-81 1993
- Urata H, Nishimura H, Ganten D: Mechanisms of angiotensin II formation in humans. *Eur Heart J* 16 Suppl N: 79-85 1995
- Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Griendling KK: p38 Mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J Biol Chem*. 273:15022-9, 1998
- Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Yin Q, Fujio Y, Walsh K, Griendling KK: Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 274: 22699-704, 1999

- Vaidya S, Somers EP, Wright SD, et al: 15-deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits the beta2 integrin-dependent oxidative burst: Involvement of a mechanism distinct from peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligation. *J Immunol* 163: 6187-6192, 1999
- van Kats JP, Danser AH, van Meegen JR, Sassen LM, Verdouw PD, Schalekamp MA: Angiotensin production by the heart: a quantitative study in pigs with the use of radiolabeled angiotensin infusions. *Circulation* 98: 73-81 1998
- Velloso LA, Folli F, Sun XJ, White MF, Saad MJ, Kahn CR: Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 12490-5, 1996
- Venema RC, Venema VJ, Eaton DC, Marrero MB: Angiotensin II-induced tyrosine phosphorylation of signal transducers and activators of transcription 1 is regulated by Janus-activated kinase 2 and Fyn kinases and mitogen-activated protein kinase phosphatase 1. *J Biol Chem* 273: 30795-30800, 1998
- Ventura JJ, Kennedy NJ, Flavell RA, Davis RJ: JNK regulates autocrine expression of TGF- β 1. *Mol Cell* 15: 269-278, 2004
- Vodovotz Y, Bogdan C, Paik J, Xie QW, Nathan C. Beatrice and Samuel A: Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor beta. *J Exp Med* 178: 605-13, 1993
- Von Thün A, Vari R, El Dahr S, Navar L: Augmentation of intrarenal angiotensin II levels by chronic angiotensin II infusion. *Am J Physiol* 266: 120-128, 1994
- Vouldoukis I, Becherel PA, Riveros-Moreno V, Arock M, da Silva O, Debre P, Mazier D, Mossalayi MD: Interleukin-10 and interleukin-4 inhibit intracellular killing of *Leishmania infantum* and *Leishmania major* by human macrophages by decreasing nitric oxide generation.. *Eur J Immunol* 27: 860-5, 1997
- Vrtovsnik F, Couette S, Prie D, Lallemand D, Friedlander G: Lovastatin-induced inhibition of renal epithelial tubular cell proliferation involves a p21^{ras} activated, AP-1-dependent pathway. *Kidney Int* 52: 1016-1027, 1997
- Waiser J, Dell K, Bohler T, Dogu E, Gaedeke J, Budde K, Neumayer HH: Cyclosporine A up-regulates the expression of TGF-beta 1 and its receptors type I and type II in rat mesangial cells. *Nephrol Dial Transplant* 17: 1568-1577, 2002
- Wax SD, Tsao L, Lieb ME, Fallon JT, Taubman MB: SM-20 is a novel 40 kd protein whose expression in the arterial wall is restricted to smooth muscle. *Lab Invest* 74: 797-808, 1996
- Weber H, Taylor DS, Molloy CJ: Angiotensin II induces delayed mitogenesis and cellular proliferation in rat aortic smooth muscle cells. Correlation with the expression of specific endogenous growth factors and reversal by suramin. *J Clin Invest* 93:788-98, 1994
- Weinberg RA: The retinoblastoma protein and the cell cycle. *Cell* 81: 323-330, 1995
- Welsh CF, Roovers K, Villanueva J, Liu Y, Schwartz MA, Assoian RK: Timing of cyclin D1 expression within G1 phase is controlled by Rho. *Nat Cell Biol* 3: 950-957, 2001
- Whiteside C, Munk S, Zhou X, Miralem T, Templeton DM: Chelation of intracellular calcium prevents mesangial cell proliferative responsiveness. *J Am Soc Nephrol* 9: 14-25, 1998
- Wijnen RMH, Ericzon BG, Tiebosch ATGM, Beysens AJ, Groth CG, Kootstra G: Toxicity of FK-506 in the cynomolgus monkey: noncorrelation with FK-506 serum levels. *Transplant Proc* 23: 3101-3104, 1991
- Wolf G, Haberstroh U, Neilson EG: Angiotensin II stimulates the proliferation and biosynthesis of type I collagen in cultured murine mesangial cells. *Am J Pathol* 140: 95-107, 1992

- Wolf G, Jablonski K, Schroeder R, Reinking R, Shankland SJ, Stahl RA: Angiotensin II-induced hypertrophy of proximal tubular cells requires p27Kip1. *Kidney Int* 64: 71-81, 2003
- Wolf G, Mueller E, Stahl RA, Ziyadeh FN: Angiotensin II-induced hypertrophy of cultured murine proximal tubular cells is mediated by endogenous transforming growth factor-beta. *J Clin Invest* 92: 1366-1372, 1993
- Wolf G, Neilson EG: Angiotensin II as a renal cytokine. *News in Physiol Science* 9: 40-42, 1994
- Wolf G, Neilson EG: Angiotensin II as a renal growth factor. *J Am Soc Nephrol* 3: 1531-1540, 1993
- Wolf G, Schroeder R, Stahl RA: Angiotensin II induces hypoxia-inducible factor-1 alpha in PC 12 cells through posttranscriptional mechanism: role of AT2 receptor. *Am J Nephrol* 24: 415-421, 2004
- 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
- Wolf G, Sharma K, Chen Y, Ericksen M, Ziyadeh FN: High glucose-induced proliferation in mesangial cells is reversed by autocrine TGF- β . *Kidney Int* 42: 647-656, 1992
- Wolf G, Thaiss F, Stahl RA: Cyclosporine stimulates expression of transforming growth factor-beta in renal cells. Possible mechanism of cyclosporines antiproliferative effects. *Transplantation* 60: 237-241, 1995a
- 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, 1995b
- Wolf G, Ziyadeh FN: Renal tubular hypertrophy induced by angiotensin II. *Semin Nephrol* 17: 448-454, 1997
- Wolf G, Ziyadeh FN: Renal tubular hypertrophy induced by angiotensin II. *Semin Nephrol* 17: 448-454, 1997
- Wolf G: Cell cycle regulation in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 77: S59-S66, 2000
- Wolf G: Regulation of renal tubular growth: effects of angiotensin II. *Exp Nephrol* 2: 107-114, 1994
- Wu JC: Mycophenolate mofetil: Molecular mechanism of action. *Perspectives in Drug Discovery and Design* 2: 185-204, 1994
- Xie QW, Whisnant R, Nathan C, Beatrice and Samuel A: Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* 177: 1779-84, 1993
- Yamabe H, Osawa H, Kaizuka M, Tsunoda S, Shirato K, Tateyama F, Okumura K. Platelet-derived growth factor, basic fibroblast growth factor, and interferon gamma increase type IV collagen production in human fetal mesangial cells via a transforming growth factor-beta-dependent mechanism. *Nephrol Dial Transplant* 15: 872-6, 2000
- Yamada T, Akishita M, Pollman MJ, Gibbons GH, Dzau VJ, Horiuchi M: Angiotensin II type 2 receptor mediates vascular smooth muscle cell apoptosis and antagonizes angiotensin II type 1 receptor action: an in vitro gene transfer study. *Life Sci* 63: PL289-295, 1998
- Yamada T, Horiuchi M, Dzau VJ: Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 156-160, 1996

Yamaguchi Y: Clinicopathological evaluation of kidney transplants in patients given a fixed dose of FK-506. *Transplant Proc* 23: 3111-3115, 1991

Yang T, Sun D, Huang YG, Smart A, Briggs JP, Schnermann JB: Differential regulation of COX-2 expression in the Kidney by lipopolysaccharide: Role of CD14. *Am J Physiol* 277:F10-F16, 1999

Yoshimura A, Gordon K, Alpers CE, Floege J, Pritzl P, Ross R, Couser WG, Bowen- Pope DF, Johnson RJ: Demonstration of PDGF-B-chain mRNA in glomeruli in mesangial proliferative nephritis by *in situ* hybridisation. *Kidney Int* 40: 470-476, 1991

Yoshimura A, Nemoto T, Sugeno Y, Inui K, Watanabe S, Inoue Y, Sharif S, Yokota N, Uda S, Morita H, Ideura T: Effect of simvastatin on proliferative nephritis and cell-cycle protein expression. *Kidney Int Suppl* 71: S84-87, 1999

Yoshioka T, Mitarai T, Kon V, Deen WM, Rennke HG, Ichikawa I: Role of angiotensin II in an overt functional proteinuria. *Kidney Int* 30: 538-545, 1986

Young BA, Johnson RJ, Alpers CE, Eng E, Gordon K, Floege J, Couser WG, Seidel K: Cellular events in the evolution of experimental diabetic nephropathy. *Kidney Int* 47: 935-944, 1995

Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Shah A, Harrison DG, Taylor WR, Griendling KK: Role of NADH/NADPH oxidase-derived H₂O₂ in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension* 32: 488-95, 1998

Zagorska A, Dulak J: HIF-1: the knows and unknowns of hypoxia sensing. *Acta Biochim Pol* 51: 563-585 2004

Zahner G, Wolf G, Ayoub M, Reinking R, Panzer U, Shankland SJ, Stahl RAK: Cyclooxygenase-2 overexpression inhibits platelet-derived growth factor-induced mesangial cell proliferation through induction of the tumor suppressor gene p53 and the cyclin-dependent kinase inhibitors p21^{waf-1/cip-1} and p27^{kip-1}. *J Biol Chem* 277: 9763-9771, 2002

Ziolkowski J, Paczek L, Senatorski G, Niewczas M, Oldakowska-Jedynak U, Wyzgal J, Sanko-Resmer J, Pilecki T, Zieniewicz K, Nyckowski P, Patkowski W, Krawczyk M: Renal function after liver transplantation: calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Transplant Proc* 35: 2307-2309, 2003

Ziswiler R, Steinmann-Niggli K, Kappeler A, Daniel C, Marti HP: Mycophenolic acid: a new approach to the Therapy of experimental mesangial proliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 9: 2055-66, 1998

Zwiller J, Sassone-Corsi P, Kakazu K, Boynton AL: Inhibition of PDGF-induced c-jun and c-fos expression by a tyrosine protein kinase inhibitor. *Oncogene* 8: 219-221, 1991

8. Veröffentlichungen

Kurzartikel (Abstracts) für Tagungen und Kongresse:

Blume C, **Sabuda-Widemann D**, Plum J, Heering P, Grabensee B. Mycophenolic acid and CyA inhibit proliferation of cultured rat mesangial cells. Symposium „Renal tubular cells in culture“ 4. - 5.12.1998 in Antwerpen

Blume C, **Sabuda-Widemann D**, Plum J, Heering P, Grabensee B. Mycophenolic acid and FK-506 inhibit proliferation of cultured rat mesangial cells. *Kidney and Blood Pressure Research* 22:264 (P159), 1999, Kongress für Nephrologie 18 - 21. 09.1999 in Freiburg

Blume C, **Sabuda-Widemann D**, Plum J, Heering P, Grabensee B. Effect of immunosuppressive drugs on mesangial cell proliferation and expression of mesangial early genes. *Kidney and Blood Pressure Research* 23:P33, 2000, Kongress für Nephrologie 02. – 05.09. 2000 in Wien

Blume C, **Sabuda-Widemann D**, Heise G, Plum J, Heering P, Beck K-F, Pfeilschifter J, Schrör K, Grabensee B. The Antiproliferative Effect of Cerivastatin on Rat Mesangial Cells is Associated with an Enhanced iNOS and COX-2 Expression. *Kidney and Blood Pressure Research* 24:241 (V 71), 2001, Kongress für Nephrologie 29.09. - 02.10.2001 in Münster

Blume C, **Sabuda-Widemann D**, Beck K-F, Pfeilschifter J, Schrör K, Plum J, Heering P, Grabensee B. The antiproliferative effect of cerivastatin on cytokine induced proliferation of mesangial cells is associated with an increased expression of the inducible NO synthase and cyclooxygenase 2. (Abstract Nr. 46) 14th Meeting of the European Renal Cell Study Group 21 - 24.03.2002 in Oxford

Blume C, Gogolok N, **Sabuda-Widemann D**, Tiemann B, Grabensee B, Plum J. Valsartan inhibits hypertrophy of angiotensin II-stimulated rat mesangial cells and decreases mRNA expression of Egr-1. *Kidney and Blood Pressure Research* 25:152 (P 055), 2002, Kongress für Nephrologie 28.09. – 01.10. 2002 in Düsseldorf

Blume C, **Sabuda-Widemann D**, Beck K-F, Pfeilschifter J, Schrör K, Plum J, Heering P, Grabensee B. The cytokine-induced expression of the inducible NO synthase and cyclooxygenase-2 in rat mesangial cells is increased by cerivastatin. *Kidney and Blood Pressure Research* 25:136 (V 054), 2002, Kongress für Nephrologie 28.09. - 01.10. 2002 in Düsseldorf

Blume C, Gogolok N, **Sabuda-Widemann D**, Plum J, Beck K-F, Pfeilschifter J, Grabensee B. Ang II stimulated endoreplication of renal mesangial cells is inhibited by AT-1 receptor blockers but not by ACE-Inhibitors. *Oxford Journals Nephrology Dialysis Transplantation* 18 Suppl 4:315 (T106), 2003, World Congress of Nephrology 08. - 12.06.2003 in Berlin

Blume C, **Sabuda-Widemann D**, Pfeilschifter J, Grabensee B, Beck K-F. Mycophenolat-Mofetil inhibits autocrine PDGF-BB-Secretion in serum-stimulated rat mesangial cells. *Kidney and Blood Pressure Research* 27:408 (P15.25), 2004, Kongress für Nephrologie 18. - 21.09.2004 in Basel

Widemann D, Grabensee B, Beck KF, Blume C. Blocking of COX-2 activity does not modulate the antiproliferative effect of cerivastatin in IL-1 β stimulated rat mesangial cells. *Nephro - News Forum für Nephrologie und Hypertensiologie*, Abstracts:79-80 (P 07.15), 2005 Kongress für Nephrologie 17 - 20. 09. 2005 in Saarbrücken

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften:

Blume C, **Sabuda-Widemann D**, Pfeilschifter J, Plum J, Schror K, Grabensee B, Beck KF. Cerivastatin inhibits proliferation of interleukin-1 beta-induced rat mesangial cells by enhanced formation of nitric oxide. *Eur J Pharmacol* 485:1-10, 2004

Sabuda-Widemann D, Blume C, Beck KF, Pfeilschifter J, Grabensee B. Mycophenolic acid inhibits the autocrine PDGF-B-synthesis in rat mesangial cells (in Vorbereitung).

9. Danksagung

Beim Erstellen der Vorliegenden Promotionsarbeit haben mich viele Personen auf die unterschiedlichsten Arten unterstützt. An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. B. Grabensee für die Überlassung des Thema dieser Arbeit, die Betreuung und sein entgegengebrachtes Interesse an meiner Arbeit sowie für die Möglichkeit an verschiedenen wissenschaftlichen Kongressen teilnehmen zu können.

Prof. Dr. F. Wunderlich danke ich für die Betreuung und freundliche Übernahme des Korreferates.

Prof. Dr. J. Plum danke ich herzlich für die Unterstützung meiner Dissertation und beratende und wertvolle Gespräche.

Frau Dr. C. Blume danke ich für die Betreuung der Arbeit, ständige Diskussionsbereitschaft und kritische Anregungen sowie für das Korrekturlesen der Dissertation.

Prof. Dr. R. Haas danke ich für die Möglichkeit in Räumen des molekulargenetischen Labors des Hämatologischen Instituts der HHU Düsseldorf als Gast arbeiten zu dürfen und den Mitarbeitern dieses Instituts für die freundliche Atmosphäre.

Ebenso danke ich Prof. Dr. H. B. Bender und Dr. D. Niederacher für die Möglichkeit im Zellkulturlabor der Universitätsfrauenklinik mitarbeiten zu dürfen. Besonders möchte ich einem der Mitarbeiter dieses Instituts Gernot Schröder danken, dass er mir den Zugang zu dem ELISA-Reader des Instituts für onkologische Chemie ermöglichte. Unser ELISA Reader verfügte nicht über die Filter, die für Protein-Bestimmung nötig waren.

Ein Dank geht auch an Prof. Dr. K. Schrör für die Möglichkeit, die densitometrische Analyse von Western-Blots mit Hilfe der Biometra Apparatur in dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der HHU Düsseldorf durchzuführen und für die Durchführung der Prostaglandinmessung.

Den Mitarbeitern des BMFZ danke ich für die Durchführung der Sequenzierung der PCR-Produkte. Frau Sybille Müller danke ich für die hilfreiche Unterstützung bei meinen ersten Erfahrungen mit Western-Blot.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. J. Pfeilschifter für seine Gastfreundlichkeit und Betreuung während meiner Aufenthalte in dem Institut für Pharmakologie und

Toxikologie an der J.-W.-Goethe-Universität in Frankfurt sowie für das Überlassen der Mesangiumzellen. Hier möchte ich danken der „iNOS-Arbeitsgruppe“ für die sehr freundliche Arbeitsatmosphäre, Dr. K-F. Beck für zahlreiche beratende und unterstützende Gespräche und Frau Martina Appel für die hilfreiche Einarbeitung in Zellkultur sowie molekularbiologische Methoden.

An dieser Stelle möchte ich noch zwei Mitarbeiter des Instituts für Nephrologie an der HHU Düsseldorf namentlich nennen: Frau Astrid Stangelmayer und Herrn Dr. Bernd Tiemann. Frau Stangelmayer war sehr hilfsbereit bei Lösungen verschiedener Organisationsprobleme, besonders bei Bestellungen und Lieferungen von Labormaterial. Dr. B. Tiemann danke ich für die praktische Erklärung der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine sowie die ausführliche Erklärung des Programms Tina 2.09.

Zuletzt möchte ich mich bei meinem Ehemann, Janusch Widemann, und bei meiner Tochter, Lavinia, bedanken. Sie mussten schon auf eine stattliche Anzahl gemeinsamer Stunden verzichten. Dabei war mein Mann mir immer ein wichtiger Diskussionspartner, besonders bei der statistischen Auswertung der Daten meiner Arbeit. Er war auch eine große Hilfe bei der Lösung vielfältiger „Computerprobleme“, die mit der redaktionellen Gestaltung der Arbeit verbunden waren. Ich danke beiden für ihre Geduld und ihr Verständnis.

10. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass ich die vorliegende Doktorschrift selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt, andere als von mir angegebene Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt, den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe, und dass diese Doktorschrift an keiner anderen Fakultät eingereicht worden ist.

Düsseldorf, den 31.10. 2005

Danuta Sabuda-Widemann