

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Georg Ertl

Proliferationsverhalten
kultivierter Mesangialzellen und glatter Gefäßmuskelzellen
nach Stimulation mit Angiotensin II und atherogenen Lipoproteinen
– Rezeptorbeteiligung –

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius – Maximilians – Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Martin Wagner
aus Rothenburg ob der Tauber

Würzburg, April 2005

Referent: Prof. Dr. med. Jan Galle
Koreferentin: Prof. Dr. med. Christiane Angermann
Dekan: Prof. Dr. med. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Juli 2005

Der Promovend ist Arzt

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	1
1.1 Athero- und Glomerulosklerose	1
1.2 Pathophysiologie der Athero- und Glomerulosklerose	2
1.2.1 Endotheliale Dysfunktion	2
1.2.2 Oxidativer Stress	3
1.2.3 „Fatty streak“ und Atherombildung	4
1.2.4 Glomerulosklerose	5
1.3 Angiotensin II	5
1.3.1 Stoffwechsel	5
1.3.2 Angiotensin II-Rezeptoren	6
1.3.3 Angiotensin II und Gefäßtonus	6
1.3.4 Angiotensin II: Direkte Zellauswirkungen und Zellzyklus	7
1.4 Plasmalipoproteine	9
1.4.1 Stoffwechsel	9
1.4.2 Oxidierte Low Density Lipoproteine (oxLDL)	9
1.4.3 OxLDL: Vasomotorik und oxidativer Stress	10
1.4.4 OxLDL: Direkte Zellauswirkungen und Zellzyklus	11
1.4.5 OxLDL-Rezeptoren	12
1.5 Angiotensin II und oxidierte Lipoproteine	13
1.5.1 Zusammenwirken auf Gefäß- und zellulärer Ebene	13
1.5.2 Interaktionen in klinischen Studien	14
1.6 Zielsetzung	16

2	Material und Methoden	17
2.1	Primärzellkultur	17
2.1.1	Menschliche Mesangialzellen (NHMC)	17
2.1.1.1	Präparation	17
2.1.1.2	Typisierung mittels Immunhistochemie	18
2.1.1.3	Kultur	19
2.1.2	Glatte Muskelzellen aus der Rinderaorta (BSMC)	19
2.1.2.1	Präparation	19
2.1.2.2	Typisierung mittels Immunhistochemie	20
2.1.2.3	Kultur	20
2.2	Proliferationsnachweis	21
2.2.1	³ H-Thymidin-Einbau	21
2.2.2	MTT-Assay	22
2.2.3	Auswertung und Statistik	22
2.3	Western Blot	23
2.3.1	Versuchsdurchführung	23
2.3.2	Auswertung und Statistik	24
2.4	Histochemie – Dil-oxLDL-Interaktion	25
2.5	Dil-oxLDL-Internalisierung – fluorometrische Bestimmung	25
2.5.1	Versuchsdurchführung	25
2.5.2	Auswertung und Statistik	26
2.6	Präparation der Lipoproteine	26
2.6.1	Low Density Lipoproteine (LDL)	26
2.6.2	Oxidation der LDL	27
2.6.3	Fluoreszenzmarkierung der oxidierten LDL	28
2.7	Material	28
2.7.1	Substanzen	28
2.7.2	Lösungen	31

3	Ergebnisse	32
3.1	Proliferationsnachweis mittels ³H-Einbau in BSMC	32
3.1.1	Proliferation durch FCS	32
3.1.2	Angiotensin II	33
3.1.3	Lipoproteine	34
3.1.4	Angiotensin II und Lipoproteine	35
3.2	Proliferationsnachweis mittels ³H-Einbau in NHMC	36
3.2.1	Proliferation durch FCS	36
3.2.2	Angiotensin II	37
3.2.3	Lipoproteine	38
3.2.4	Angiotensin II und Lipoproteine	39
3.3	Proliferationsnachweis mittels MTT-Assay in BSMC	40
3.3.1	Oxidierte LDL	41
3.3.2	Angiotensin II	42
3.4	Proliferationsnachweis mittels MTT-Assay in NHMC	43
3.4.1	Oxidierte LDL	43
3.4.2	Angiotensin II	45
3.5	Rezeptornachweis mittels Western Blot	46
3.5.1	Stimulation der Rezeptordichte in NHMC	46
3.5.1.1	AT ₁ -Rezeptor	46
3.5.1.2	AT ₂ -Rezeptor	48
3.5.2	Rezeptordichte in höheren Zellkultur-Passagen	49
3.5.2.1	AT ₁ -Rezeptor	49
3.5.2.2	AT ₂ -Rezeptor	50
3.5.3	Rezeptordichte in unterschiedlichen Primärzellen bzw. Zelllinien	51
3.5.3.1	AT ₁ -Rezeptor	52
3.5.3.2	AT ₂ -Rezeptor	53
3.5.3.3	LOX-1-Rezeptor	54
3.6	Interaktion von Dil-oxLDL in der Histochemie in BSMC	55
3.7	Dil-oxLDL-Internalisierung in NHMC	57

4	Diskussion	58
4.1	Effekte atherogener Lipoproteine	59
4.1.1	LDL induzieren Proliferation in BSMC und NHMC	59
4.1.2	OxLDL wird über Endozytose internalisiert	60
4.1.3	Der LOX-1-Rezeptor wird auf BSMC und NHMC exprimiert	61
4.1.4	Die Rolle von LDL im Zellzyklus	62
4.2	Effekte von Angiotensin II	64
4.2.1	Angiotensin II und Proliferation	64
4.2.2	Angiotensin II-Rezeptoren	66
4.2.3	Die Rolle des AT ₁ - und AT ₂ -Rezeptors im Zellzyklus	67
4.3	Interaktion von LDL und Angiotensin II	70
4.3.1	Modifikation der Einzeleffekte	70
4.3.2	Therapeutische Ansätze	71
5	Zusammenfassung	74
6	Literaturverzeichnis	77
7	Abbildungsverzeichnis	96
8	Abkürzungsverzeichnis	97

Danksagung

Lebenslauf

1 Einleitung

1.1 Athero- und Glomerulosklerose

Die Atherosklerose ist eine weitverbreitete Krankheit in der westlichen Gesellschaft. Als sogenannte „Wohlstandserkrankung“ nimmt ihre Prävalenz weltweit zu und ihre Folgen – Herzinfarkt, Schlaganfall und fortschreitende Niereninsuffizienz – werden zum immer größer werdenden sozialen und auch wirtschaftlichen Problem. Deshalb muss die Entstehung dieser Gefäßschädigung weiter hinterfragt werden, um in Zukunft sowohl präventiv agieren zu können, als auch um die Behandlung dieser Erkrankung weiter zu verbessern.

In allen von ihr betroffenen Organen ist die Einengung der Gefäßlumina ein erstes sichtbares Zeichen. Anfangs entsteht die Verdickung der Gefäßwand durch Einwanderung von Monozyten in die Tunica intima, die sich dann in sogenannte „Schaumzellen“ umwandeln. Im Präparat hinterlässt dies einen sichtbaren „Fettstreifen“. Zusätzlich ist diese Stelle des blutführenden Systems für eine Thrombusbildung auf dem Boden des erkrankten Endothels, das die Gefäßwand auskleidet, gefährdet. Später bildet sich ein fibrinöser Plaque, das sogenannte „Atherom“, das eine Ansammlung unter anderem von Schaumzellen, Zelltrümmern, Bindegewebe und Cholesterinkristallen darstellt, und das den Gefäßquerschnitt weiter einengt ¹.

An den großen und mittleren Gefäßen führt dies beispielsweise auf kardialer Ebene zu den klinischen Symptomen der Angina Pectoris. Wird ein Herzkranzgefäß auf diese Weise immer weiter geschädigt, kann sich ein auf der Oberfläche entstandener Thrombus lösen und abgeschwemmt werden, oder es kann sich auch das Atherom eröffnen, und das Gefäß wird durch die abgesprengten Trümmer oder ein neu gebildetes Gerinnsel auf dem Boden des eröffneten Plaques akut verschlossen, was einen akuten Myokardinfarkt bedeutet ². Da die Atherosklerose auch an den kleinen und kleinsten Gefäßen stattfindet, lässt sich beispielsweise in der Niere diese Schädigung an einer progredienten Einschränkung der Nierenleistung erkennen. Ausdruck für diese Veränderung der Nierenkörperchen (Glomeruli) ist eine reduzierte glomeruläre Filtrationsrate und die Entwicklung einer Albumin- bzw. Proteinurie. Das Endbild dieser Verände-

rungen wird Glomerulosklerose genannt und führt, falls die Erkrankung nicht frühzeitig behandelt wird, unaufhaltsam zum Verlust der Nierenfunktion und somit zur Dialysepflichtigkeit des Patienten ³.

1.2 Pathophysiologie der Athero- und Glomerulosklerose

1.2.1 Endotheliale Dysfunktion

Die Grundlage der Gefäßverkalkung bildet nach herrschender Lehrmeinung eine Endotheldysfunktion ⁴⁻⁷. Mehrere Risikofaktoren sind hieran beteiligt, so zum Beispiel die Hypertonie, die Hypercholesterinämie, ein Nikotinabusus und ein bestehender Diabetes mellitus ⁵. Unbeeinflussbare Größen sind außerdem ein erhöhtes Lebensalter, eine genetische Belastung und das männliche Geschlecht ¹. Jedoch stellen auch chronische Entzündungssituationen sowie die Homocysteinämie unabhängige Größen dieser Entwicklung dar ⁸. Ob virale oder bakterielle Infektionen direkt die Entstehung der endothelialen Dysfunktion und hierüber die Atherosklerose bewirken können, muss Gegenstand weiterer Untersuchungen sein ⁹.

Die endotheliale Schädigung bewirkt einen Verlust von physiologischen Barrierefunktionen des Endothels. So gelangen Plasmalipoproteine, v.a. die Low Density Lipoproteine (LDL) und die Very Low Density Lipoproteine (VLDL), durch vesikulären Transport und Konvektion in den subendothelialen Raum ¹⁰ und werden beim Durchtritt durch diese Schicht oxidativ verändert (oxLDL) ¹¹⁻¹³.

Auf den Endothelzellen werden nun spezifische Rezeptoren bzw. Adhäsionsmoleküle exprimiert, die zur Anlagerung sowohl von Monozyten als auch von Thrombozyten führen. Die Monozyten wandern in die Intima ein und setzen dort, stimuliert unter anderem durch oxLDL, O₂⁻-Radikale frei ^{14,15}. Diese hochreaktiven Sauerstoffradikale bewirken ihrerseits eine gesteigerte Oxidierung der Lipoproteine, was somit einen circulus vitiosus darstellt, und reagieren mit Stickstoffmonoxid (NO) stöchiometrisch zu Peroxinitrit (ONOO⁻) ^{16,17}. Sowohl O₂⁻ ^{18,19} als auch Peroxinitrit ²⁰ induzieren wiederum eine Steigerung der Endotheldysfunktion.

1.2.2 Oxidativer Stress

Auf die Beteiligung von Stickstoffmonoxid (NO) und des Superoxidanions (O_2^-) soll an dieser Stelle etwas genauer eingegangen werden.

Gesunde Arterien sind im Ruhezustand vorwiegend relaxiert, was vor allem durch den „Endothelial Derived Relaxing Factor“ (EDRF) bewirkt wird²¹, der mittlerweile als Stickstoffmonoxid identifiziert wurde^{22,23}. Gebildet mit Hilfe von verschiedenen NO-Synthasen aus L-Arginin entfaltet NO vorwiegend über einen cGMP (zyklisches Guanin-Mono-Phosphat) gekoppelten Prozess seine relaxierende Wirkung.

Einer seiner physiologischen Gegenspieler, das Superoxidanion, wirkt demgegenüber vasokonstriktorisch. Unterschiedliche Einflüsse wie z.B. Rezeptorbindungen führen zu einer Sensibilisierung des kontraktile Apparates für Kalzium²⁴, bzw. zu einer vermehrten Mobilisierung von zytosolischem Kalzium²⁵ und damit zu einer Kontraktion. O_2^- wird im Endothel und in glatten Muskelzellen hauptsächlich über die NADH/NADPH-Oxidase produziert, es existieren aber über Cytochrom P450 oder Cyclooxygenase vermittelte Wege auch andere Bildungsmöglichkeiten²⁶. Zusätzlich sind Superoxidanionen und andere „reactive oxygen species“ (ROS) an der unspezifischen Abwehr des Immunsystems beteiligt¹⁸.

Im gesunden menschlichen Körper stehen die Bildung von ROS und der Abbau dieser Stoffe, z.B. durch die Superoxiddismutase (SOD) aber auch andere Enzyme, im Gleichgewicht. Eine Verschiebung auf die Radikalen generierende Seite wird als oxidativer Stress bezeichnet. Mittlerweile ist für viele unterschiedliche Stoffe in mindestens ebenso vielen Zellarten und Geweben gezeigt, dass sie oxidativen Stress bewirken können, so z.B. für Angiotensin II²⁷ und auch für die Hypercholesterinämie²⁸. Dies soll später genauer erläutert werden.

Oxidativer Stress beeinflusst jedoch nicht nur die Kontraktilität der Gefäße, sondern hat auch Auswirkungen auf den Zellzyklus. Unter verschiedenen Bedingungen kann hier ein Stillstand in der G₁-Phase, der die Zelle hypertrophieren lässt, oder auch ein Fortschreiten im Zellzyklus bewirkt werden, was wiederum entweder zur Proliferation führt oder, bei fehlenden Substraten oder unzureichenden Lebensbedingungen, zur Apoptose der Zellen²⁹.

Vor diesem Hintergrund lassen sich nun die weiteren Vorgänge im atherosklerotischen Gefäß differenzierter betrachten. Diese zeichnen sich im Vergleich zum gesunden Gefäß also auch durch einen erhöhten Zellumsatz aus, was wiederum die Ausbildung des Atheroms als auch dessen Stabilität nachhaltig beeinflusst^{30,31}.

1.2.3 „Fatty streak“ und Atherombildung

Durch die nun geringere Menge an verfügbarem NO, das physiologisch eine Aggregation von Thrombozyten zu verhindern vermag, lagern sich diese nun am geschädigten Endothel an und bewirken ebenso wie die in die Intima eingewanderten Monozyten (s.o.) eine Expression von verschiedenen Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1 oder E-Selectin auf den Endothelzellen. Lymphozyten und weitere Monozyten können in den subendothelialen Raum einwandern, in dem letztere sich, stimuliert durch Wachstumsfaktoren wie CSF (Colony stimulation factor), in Makrophagen umwandeln³².

Makrophagen und Myozyten können nun LDL und oxLDL aufnehmen^{33,34} und werden zu sogenannten „Schaumzellen“, die ihrerseits die Fähigkeit zur Migration verloren haben. Sie bilden zusammen mit den Lymphozyten und intimalen Muskelzellen den sichtbaren Fettstreifen, den „Fatty streak“.

Diese Veränderungen beantwortet der Körper mit einer Entzündungsreaktion, auch „response to injury“ genannt. Sie beginnt mit einer zusätzlichen Ödembildung und veranlasst alle bereits beschriebenen Zellen dazu, Chemokine, Zytokine und verschiedenste Wachstumsfaktoren, z.B. Platelet derived growth factor (PDGF) oder auch Interleukin-1 (IL-1) und Tumor necrosis factor α und β (TNF α und β) zu synthetisieren. Myozyten aus der Media proliferieren und wandern in die Intima ein. Ebenso werden Anteile der extrazellulären Matrix gebildet, wie z. B. Kollagen, Elastin und Proteoglycane. Diese Atherombildung ist im Gegensatz zum „fatty streak“ irreversibel⁶.

1.2.4 Glomerulosklerose

Treten diese atherosklerotischen Veränderungen in der Niere auf, spricht man von Glomerulosklerose. Diese ist einerseits durch die eben beschriebenen Vorgänge an den Arteriolen gekennzeichnet, als auch durch organspezifische zusätzliche Ereignisse.

Auch im Glomerulum stellt unter anderem eine veränderte Lipidpermeabilität als Folge der Endothelschädigung den Beginn dieser Schädigung dar³⁵⁻³⁷.

Die in den Glomeruli ursprünglich nur als „Stützzellen“ verkannten Mesangiumzellen spielen bei den spezifischen Veränderungen eine besondere Rolle. Sicherlich stabilisieren sie und die von ihnen synthetisierte mesangiale Matrix die Glomeruli, die teilweise sehr hohen Druckschwankungen ausgesetzt sind. Jedoch können auch sie bestimmte Zytokine freisetzen oder sind zur Phagozytose von Immunkomplexen, wie sie bei verschiedenen glomerulären Erkrankungen anfallen, befähigt³⁸. Im vorliegenden Fall ist ihre Fähigkeit hervorzuheben, O_2^- -Radikale zu bilden³⁹. Auch juxtaglomeruläre Zellen, eine weitere spezifische Zellart in direkter Nachbarschaft zum Glomerulum, können diese Metabolite synthetisieren⁴⁰. Oxidative Veränderung von Lipoproteinen wurde in den geschädigten Glomeruli ebenso nachgewiesen⁴¹, wie proliferierte Mesangiumzellen, eingebettet in eine stark vermehrte Mesangialmatrix, die die Grundlage für die Verkalkung der Nierenkörperchen darstellt⁴².

1.3 Angiotensin II

1.3.1 Stoffwechsel

Im menschlichen Körper bilden bei einer niedrigen Serumnatriumkonzentration sowie einer eingeschränkten Nierenfunktion Epitheloidzellen der Vasa afferentia, die sogenannten juxtaglomerulären Zellen, das Hormon Renin, das eine Abspaltung des Dekapeptids Angiotensin I von Angiotensinogen bewirkt. Dieses wird v.a. durch das „Angiotensin Converting Enzym“ (ACE), das vornehmlich in der Lunge aber auch im Blut und verschiedenen Geweben, zudem in hoher Konzentration auch in atherosklerotischen Läsionen⁴³ zu finden ist, in das

Oktapeptid Angiotensin II umgewandelt. Angiotensin II entfaltet seine Blutdruck steigernde Wirkung einerseits über eine direkte Vasokonstriktion, andererseits über die vermehrte Ausschüttung von Aldosteron, was zur Natriumresorption im Tubulusapparat und damit zur Wasserretention führt ⁴⁴.

1.3.2 Angiotensin II-Rezeptoren

Angiotensin II vermittelt seine biologische Aktivität v.a. über zwei spezifische Rezeptoren, den AT₁- und den AT₂-Rezeptor. Beide gehören in die Familie der 7-Transmembran-Rezeptoren und sind G-Protein gekoppelt, bewirken im Gewebe jedoch sehr unterschiedliche Effekte, wobei die AT₁-Rezeptor vermittelten zum aktuellen Zeitpunkt bereits detaillierter charakterisiert werden konnten.

Der AT₁-Rezeptor kann in vielen Geweben nachgewiesen werden, so z.B. in Leber und Darm ⁴⁵, jedoch auch in Zellen der Niere ⁴⁶ und des Herz-Kreislauf-Systems ⁴⁷. In vitro lässt sich die Rezeptordichte unter anderem durch LDL ^{48,49}, Insulin ⁵⁰ und Dexamethason ⁵¹ steigern, durch Angiotensin II ⁵² im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus, sowie durch NO ⁵³ verringern.

Demgegenüber wird der AT₂-Rezeptor vor allem im Uterus und den Ovarien exprimiert ^{54,55}, jedoch nimmt die Rezeptordichte nach der Geburt deutlich ab ⁵⁶. Aber auch in Zellen des Herz-Kreislauf-Systems ⁴⁷ und der Niere ⁵⁷ lässt sich der Rezeptor nachweisen. Interessanterweise wird nach einer Verletzung der Koronarien die AT₂-Rezeptordichte in diesen Gefäßen gesteigert ⁵⁸. In vitro lässt sich zudem die Expression durch Glucocorticoide und verschiedene Wachstumsfaktoren sowie Zytokine beeinflussen ⁵⁹.

1.3.3 Angiotensin II und Gefäßtonus

Wie schon erwähnt, ist der Ruhezustand der Gefäße mit einer endothelabhängigen Dilatation zu beschreiben. Eine der herausragenden Wirkungen von Angiotensin II sind seine vasokontraktischen Effekte, bzw. die Aufhebung dieses dilatierten Ruhezustands ²⁷. Angiotensin II bindet an den AT₁-Rezeptor und führt zu einer Erhöhung der Kalziumkanalsensitivität und hierdurch zu einer Steigerung der zytosolischen Kalziumkonzentration, was zur Kontraktion des

kontraktilen Apparates führt ⁶⁰. Der spezifische AT₁-Rezeptorantagonist Losartan vermag diese Wirkung in Ratten abzuschwächen ⁶¹. Auch im Rahmen einer klinischen Studie, der TREND-Studie, auf die an späterer Stelle genauer eingegangen werden soll, zeigte sich eine Reduktion dieser erhöhten Kontraktilität durch die Gabe eines ACE-Hemmers ⁶².

Ebenso führt eine AT₁-Rezeptoraktivierung zu einer vermehrten Freisetzung von Endothelin-1, einem ebenso potenten vasokonstriktorisch wirkendem Polypeptid ⁶³, das außerdem die Gefäße in einen hyperreagiblen Zustand versetzt. Diese Effekte können wiederum durch einen spezifischen AT₁-Rezeptorblocker beeinflusst werden ⁶⁴. Auf der anderen Seite wurde jedoch auch eine AT₁-Rezeptor vermittelte gesteigerte NO-Freisetzung gefunden, die die Angiotensin II bedingte Kontraktion abzuschwächen vermag ⁶⁵. Außerdem führt die Bindung von Angiotensin II an den AT₂-Rezeptor ebenso zu einer Freisetzung von NO, das bekanntlich vasodilatatorisch wirkt ⁶⁶.

Insgesamt kann man also sicherlich von einer Steigerung der Kontraktion bzw. einer Hyperreagibilität des Gefäßtonus auf Angiotensin II ausgehen, jedoch ist das Gefäßendothel offensichtlich dazu in der Lage, diese Effekte zu modulieren und auch abzuschwächen ⁶⁷.

1.3.4 **Angiotensin II: Direkte Zellauswirkungen und Zellzyklus**

Einige Schlüsselschritte in der Entstehung der Atherosklerose sind die direkte Folge von oxidativem Stress, oder, genauer gesagt, sind sie durch reaktive Sauerstoffmetabolite, z.B. O₂⁻-Radikale, vermittelt. Einige bewirken ihrerseits wiederum die weitere Entstehung von ROS bzw. führen direkt zur weiteren Endothelschädigung ⁶⁸, andere beeinflussen den Zellzyklus.

Die Bindung von Angiotensin II an den AT₁-Rezeptor führt in glatten Gefäßmuskeln zeit- und dosisabhängig zu einer Aktivierung der NADH/NADPH-Oxidase, über die O₂⁻-Radikale freigesetzt werden ⁶⁹. In Gefäßsegmenten konnte dieser Effekt durch AT₁-Rezeptorantagonisten verringert werden ²⁷. Aber auch an Endothelzellen werden über diesen Weg vermehrt Sauerstoffradikale freigesetzt ⁷⁰.

An kultivierten Gefäßmuskelzellen ließ sich über diesen Weg eine Angiotensin II induzierte Hypertrophie nachweisen ⁷¹, jedoch bewirkt Angiotensin II an diesen Zellen ebenso eine Proliferation ⁷². Auch apoptotische Wirkungen, für die der AT₂-Rezeptor verantwortlich gemacht werden kann, wurden für Angiotensin II beschrieben ⁷³, ebenso antiproliferative Effekte ⁷⁴. Weitere Schritte in der Signalkaskade beider Angiotensin-Rezeptoren stellen z.B. STAT („signal transducer and activator of transcription“) dar, an denen sich Effekte über die beiden Rezeptorsubtypen als „Antagonisten“ gegenüber zu stehen scheinen ⁷⁵.

In der Niere lassen sich ähnliche Vorgänge unter anderem an Tubuluszellen verfolgen, an denen die Bindung von Angiotensin II an den AT₁-Rezeptor zu einer Superoxidanionenfreisetzung und durch Eingreifen in den Zellzyklus zur Hypertrophie führt ⁷⁶. Ebenso kann dieser Stillstand im Zellzyklus (s.o.) in Mesangiumzellen beobachtet werden ⁷⁷, jedoch zeigte sich in anderen Studien ein Fortschreiten im Zellzyklus, ausgedrückt durch eine gesteigerte Proliferation ⁷⁸. Die Regulation dieser zellzyklusbeeinflussenden Wirkungen, möglicherweise über verstärkte oder verminderte Expression des Zyklinkinaseinhibitors p27^{kip1} ^{76,77}, muss Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Auch andere Vorgänge im Rahmen der Athero- und Glomerulosklerose konnten mittlerweile Angiotensin II vermittelten Wirkungen zugeschrieben werden, z.B. die Stimulation von Gefäßmuskelzellen in die Intima einzuwandern ⁷⁹, die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen ^{80,81}, die Aktivierung von Monozyten ⁸² oder die Produktion von Matrixproteinen durch Myozyten der Gefäßwand ⁸³. Die Synthese von extrazellulärer Substanz durch Angiotensin II wurde außerdem für Mesangialzellen gezeigt ⁸⁴, sowie auch die Inhibition des Abbaus dieser Substanzen ⁸⁵.

Somit kann Angiotensin II zum momentanen Zeitpunkt als eine der Substanzen angesehen werden, die einen beträchtlichen Beitrag zur Entstehung der Athero- und Glomerulosklerose leisten, auch wenn mittlerweile Effekte nachgewiesen werden konnten, die diese Veränderungen bremsen, oder wenigstens modulieren können.

1.4 Plasmalipoproteine

1.4.1 Stoffwechsel

Mit der Nahrung aufgenommene Lipide werden als Triglyceride und Cholesterinester im Blut in wasserlöslichen Lipid-Protein-Komplexen transportiert. Man unterscheidet diese Lipoproteine nach Größe, Dichte, Lipidzusammensetzung und ihren Apolipoproteinen, bestimmten Proteinkomplexen, die in der hydrophilen „Hülle“ der Lipoproteine eingebettet sind. Sie übernehmen einerseits Funktionen als Strukturelemente und Enzymaktivatoren, andererseits wird über sie die Bindung an die spezifischen Rezeptoren der Zielzellen reguliert.

Low Density Lipoproteine (LDL) spielen in der Entstehung der Atherosklerose eine entscheidende Rolle, so führt ein Defekt im LDL-Rezeptor, wie er bei der familiären Hypercholesterinämie auftritt, zu massiv erhöhten LDL-Spiegeln mit der Folge von ausgeprägten atherosklerotischen Veränderungen⁸⁶. Auch konnte in klinischen und tierexperimentellen Studien LDL als das hauptsächlich an den atherosklerotischen Veränderungen beteiligte Agens identifiziert werden⁸⁷. In der Leber aus Intermediate Density Lipoproteinen (IDL) gebildet, enthalten sie vor allem Cholesterinester, als Apolipoprotein lediglich Apo-B100. Dieses reguliert die Bindung an die ApoE/ApoB100-Rezeptoren der Zielzellen in der Peripherie⁸⁸, die dann die Lipoproteine über Endozytose aufnehmen und die transportierten Cholesterine und Triglyceride ins Zytoplasma freisetzen. Wegen seiner relativ geringen Affinität zum LDL-Rezeptor finden sich die LDL eine lange Zeit im Blut, was ihre Atherogenität mit bedingt.

1.4.2 Oxidierte Low Density Lipoproteine (oxLDL)

Sowohl tierexperimentell⁸⁹ als auch in hypercholesterinämischen Patienten konnte eine Akkumulation von LDL und von oxidativ veränderten LDL in der atherosklerotisch veränderten Gefäßwand gezeigt werden³⁴.

Wie bereits erwähnt, können LDL wohl auch ohne spezifische Rezeptorbindung das geschädigte Gefäßendothel durchdringen und werden hierbei und nach Aufnahme in die Zielzellen oxidiert¹². Diesen modifizierten LDL, die in vivo in

unterschiedlichsten Oxidationsgraden vorliegen⁹⁰, kommen in den weiteren Vorgängen entscheidende Rollen zu⁹¹.

Die Oxidation der LDL geschieht über verschiedene Reaktionen und Enzymsysteme, unter anderem durch Superoxidanionen⁹², Peroxinitrit⁹³ und Hydroxylradikale⁹⁴, oder über Myeloperoxidase⁹⁵ und Lipoxygenase⁹⁶ vermittelte Wege. Zusätzlich entstehen hierbei Moleküle, denen ihrerseits wiederum spezifische Eigenschaften zukommen, wie z.B. Lysophosphatidylcholin (LPC)⁹⁷. Zu den Zelltypen, die LDL oxidativ verändern können, zählen neben Zellen der Gefäßwand wie Endothelzellen und Myozyten⁹⁸ gleichfalls Makrophagen⁹⁹, aber auch Zellen der Niere, wie Mesangiumzellen¹⁰⁰ und Tubuluszellen¹⁰¹.

1.4.3 OxLDL: Vasomotorik und oxidativer Stress

Als Ausdruck der endothelialen Dysfunktion, die in hypercholesterinämischen Patienten nachgewiesen wurde^{62,102}, sollen nun die Auswirkungen von oxidierten LDL auf die Vasomotorik genauer betrachtet werden.

Im Gegensatz zu dem potenten Vasokonstriktor Angiotensin II erbrachte die Inkubation mit oxLDL in isolierten Kaninchenarterienringen keine Kontraktionsantwort¹⁰³. Jedoch sind oxLDL dazu in der Lage, die Reagibilität der Gefäße auf konstriktorische und dilatierende Reize zu modulieren.

Oxidierete Lipoproteine beeinflussen die endothelabhängige Dilatation der Gefäße über NO, so inhibieren sie sowohl zeit- und dosisabhängig die NO-Synthese¹⁰⁴, als sie auch in der Lage sind, NO selbst zu inaktivieren¹⁰⁵. In Kaninchenfemoralarterien konnte oxLDL eine bereits bestehende Kontraktion weiter verstärken¹⁰⁶.

Dass Endothelzellen diese Vorgänge entscheidend beeinflussen, zeigen Versuche, bei denen in deendothelialisierten Gefäßen oxLDL alleine eine deutliche Kontraktion bewirkte¹⁰⁷, was vermuten lässt, dass das Endothel durch dilatierende Einflüsse dazu in der Lage ist, diese direkte konstriktorische oxLDL-Wirkung abzuschwächen. Jedoch auch Endothelzellen sind durch Lipoprotein-stimulierte Endothelin-1-Freisetzung an vasokonstriktorischen Effekten beteiligt¹⁰⁸.

Einen mittlerweile bekannten Signaltransduktionsweg für oxLDL-Wirkungen stellen, ebenso wie für Angiotensin II, O_2^- -Radikale dar. In Gefäßversuchen konnte die oxLDL induzierte Wirkung durch Zugabe der O_2^- abbauenden Superoxiddismutase abgeschwächt werden ¹⁰⁹.

Sauerstoffradikalbildung aufgrund einer Inkubation mit oxLDL konnte für verschiedene Zellsysteme, unter anderem Endothelzellen ¹¹⁰, glatte Gefäßmuskelzellen ¹¹¹, Makrophagen und Monozyten ¹¹², juxtaglomeruläre Zellen ⁴⁰ und auch Mesangiumzellen ³⁹ gezeigt werden. Interessanterweise führt auch Lyso-phosphatidylcholin (LPC) an Endothelzellen ¹¹³ und Myozyten ¹¹⁴ zu einer Sauerstoffradikalfreisetzung.

Oxidativ veränderte LDL bzw. ihre „Nebenprodukte“ können also als potente Initiatoren für oxidativen Stress angesehen werden. An dieser Stelle ist besonders hervorzuheben, dass demgegenüber native LDL isoliert in kultivierten Endothelzellen und Mesangiumzellen nicht zur O_2^- -Bildung führen ¹¹⁵.

1.4.4 OxLDL: Direkte Zellauswirkungen und Zellzyklus

Oxidativer Stress beeinflusst ebenso wie die Kontraktilität der Gefäße auch den Zellzyklus einzelner Zellsysteme. Dass dies auch für oxLDL induzierte O_2^- -Freisetzung gilt, konnte unsere Arbeitsgruppe für Endothelzellen nachweisen. In ihnen führt die Inkubation mit oxLDL zu Sauerstoffradikalbildung über die NADPH-Oxidase, was in niedrigen Konzentrationen zur Proliferation führt ¹¹⁶. Proliferative Auswirkungen von oxLDL wurden zudem für Makrophagen ¹¹⁷, glatte Muskelzellen ¹¹⁸ aber auch Mesangialzellen ¹¹⁹ nachgewiesen. In höheren Konzentrationen bewirken oxLDL sowohl in Endothelzellen ¹²⁰ als auch in Myozyten ¹¹¹ und Mesangialzellen ¹²¹ Apoptose. Beide Vorgänge stellen ein Fortschreiten im Zellzyklus dar.

In anderen Versuchen konnten oxLDL eine Hypertrophie als Ausdruck eines Zellzyklusarrestes der inkubierten Endothelzellen bewirken ¹²².

In diesen Vorgängen sind die genauen Signaltransduktionswege noch nicht komplett aufgeklärt. Eine tragende Rolle scheinen ROS zu spielen, die durch die NADPH-Oxidase gebildet wurden ¹¹⁶, eine andere die GTPase RhoA ^{103,122}. Auch Veränderungen in der zytosolischen Kalziumkonzentration ¹²³ und Ex-

pressionsverminderungen oder -erhöhungen des im Zellzyklus wichtigen Zyklinkinaseinhibitors p27^{kip1} ¹²⁴ spielen in Zellzyklusentscheidungen eine Rolle.

Inwieweit sich diese Wege gegenseitig beeinflussen bzw. Ausdruck einer gemeinsamen Signaltransduktion sind, muss in weiteren Untersuchungen hinterfragt werden.

OxLDL selbst wirken konzentrationsabhängig auf verschiedene Zellkulturen zytotoxisch und bewirken Nekrose ^{94,125}. Zudem sind sie in niedrigen Konzentrationen dazu in der Lage, in an der Athero- und Glomerulosklerose beteiligten Zellen zur Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle, wie ICAM-1 und VCAM-1, und auch zur Produktion von Chemokinen und Cytokinen zu führen. Der „Makrophagen Colony Stimulating Factor“ und das „Monozyten Chemotaktische Protein-1“ sind solche Chemokine, deren durch oxLDL bewirkte Freisetzung an der Schaumzellbildung und anderen Vorgängen im atherosklerotischen Gefäß beteiligt ist ^{126,127}.

Ausdruck für die renale Schädigung ist u.a. die oxLDL bedingte TGF- β Freisetzung, die zur vermehrten Matrix-Produktion führt ¹¹⁵. Zusätzlich wird der Matrixabbau durch oxLDL gehemmt ¹⁰¹.

1.4.5 OxLDL-Rezeptoren

Oxidierter LDL besitzen nicht mehr ihr ursprüngliches Apolipoprotein Apo-B100 und können somit nicht mehr über den LDL-Rezeptor in die Zelle gelangen. Modifizierte LDL können über Scavenger-Rezeptoren (SR-A I/II, SR-BI), CD 36 oder Fc γ RII in die Zellen aufgenommen werden ¹²⁸, jedoch haben oxLDL eine hohe Affinität zum „Lectin-like OxLDL-Rezeptor 1“ (LOX-1) ¹²⁹. Dies konnte für Endothelzellen, Gefäßmuskelzellen, Makrophagen und auch für Mesangialzellen ^{128,129} gezeigt werden. In Tubuluszellen der Niere scheinen zusätzlich andere Mechanismen an der Internalisierung von oxLDL beteiligt zu sein ¹⁰¹.

Der LOX-1-Rezeptor ist ein Typ II Membran-Protein und gehört in die Familie der C-Typ-Lectin-Rezeptoren ¹³⁰. Aktuell beschäftigt sich die Wissenschaft damit, die oben aufgeführten Effekte von oxLDL den beteiligten Rezeptoren zuzuordnen, unter anderem wurde eine LOX-1 vermittelte O₂⁻-Bildung in Endothelzellen nachgewiesen ¹³¹.

Die LOX-1-Expression kann neben veränderten Strömungseigenschaften im Gefäß, sogenanntem „Fluid shear stress“¹³², auch durch TNF- α ¹²⁸, Glucose¹³³, und Angiotensin II¹³⁴ gesteigert werden. Interessanterweise bedingt oxLDL selbst im Sinne eines positiven Feedbackmechanismus eine Zunahme der Rezeptordichte an der Zellmembran¹³⁵.

Auch Lipoproteine spielen also in der Pathogenese der Athero- und Glomerulosklerose eine entscheidende Rolle, wobei den oxidativ veränderten Low Density Lipoproteinen eine besondere Bedeutung zukommt.

1.5 Angiotensin II und oxidierte Lipoproteine

In atherosklerotischen Läsionen und im sklerotisch geschädigten Glomerulus können sowohl Angiotensin II, das Angiotensin Converting Enzym¹³⁶ und oxidierte LDL¹³⁷ in enger Nachbarschaft gefunden werden. Dass dies nicht nur eine Koinzidenz ist, sondern dass vielmehr oxLDL und Angiotensin II gemeinsame Wirkungen entfalten können, lässt sich bei einer genaueren Betrachtung der Vorgänge auf Gewebs- und zellulärer Ebene teilweise belegen, teils zumindest postulieren. Auch Ergebnisse von klinischen Studien lassen solche Schlüsse zu.

1.5.1 Zusammenwirken auf Gefäß- und zellulärer Ebene

Einer der gemeinsamen Effekte beider Substanzen stellt die Superoxidanionen-Produktion über die NADPH-Oxidase dar (s.o.). In noch nicht veröffentlichten Versuchen unserer Arbeitsgruppe konnte in Endothelzellen sowohl durch oxLDL als auch durch Angiotensin II eine O_2^- -Freisetzung festgestellt werden. Bei gemeinsamer Inkubation potenzierten sich diese im Vergleich zu den jeweiligen Einzeleffekten.

Auf zellulärer Ebene ließ sich außerdem die Expression des einen Rezeptors durch die Inkubation mit dem jeweils anderen Bindungspartner steigern^{134,138}. Interessanterweise führt auch die Bindung von oxLDL an den LOX-1-Rezeptor

zu einer vermehrten Produktion von Angiotensin Converting Enzym in Endothelzellen¹³⁹.

Auch vasokonstriktorische Synergismen ließen sich belegen. In Kontraktionsversuchen mit isolierten Kaninchenaortenringen ergab die isolierte Inkubation mit Angiotensin II eine deutliche Kontraktionsantwort, die isolierte Inkubation mit oxidierten LDL führte jedoch zu keiner Kontraktion. Wurde jedoch zur Vorkontraktion mit Angiotensin II die gleiche Konzentration oxLDL zugegeben, so potenzierte sich die Kontraktion¹⁰³.

Welche Schritte hier nun die entscheidenden sind, dass die eine Substanz die Wirkung der anderen verstärken kann, muss weiter hinterfragt werden, jedoch bieten sich bereits einige Ansatzpunkte, bekannte Stationen der Signalkaskade beider Substanzen, an denen dies überprüft werden kann.

1.5.2 Interaktionen in klinischen Studien

In vielen klinischen Studien konnte mittlerweile gezeigt werden, dass durch die Hemmung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems durch ACE-Hemmer und AT₁-Rezeptorantagonisten sich nicht nur der Blutdruck effektiv senken lässt, sondern sich diese Substanzklassen außerdem durch protektive Wirkungen sowohl für die Herzkreislauf- als auch die Nierenfunktion auszeichnen^{140,141}.

In der TREND-Studie („Trial on Reversal of ENdothelial Dysfunction“) wurde speziell die Endothelfunktion unter einer Behandlung mit dem ACE-Hemmer Quinapril untersucht. Bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit, jedoch weder schwer hypertensiv noch mit eingeschränkter linksventrikulärer Funktion und ohne schwere Dyslipidämie (LDL < 160 mg/dl), ließ sich eine Verbesserung der endothelialen Funktion mittels koronarangiographisch gemessener Kontraktibilität der Koronarien nachweisen⁶².

Die HOPE-Studie („Heart Outcome Prevention Evaluation“), eine große Studie an Hochrisikopatienten – niereninsuffizienten, hypertonen, hypercholesterinämischen Diabetikern – konnte in der Gruppe der mit einem ACE-Hemmer behandelten Patienten eine Reduktion der Mortalität durch kardiovaskuläre Ereignis-

nisse belegen. Ein Zusammenhang dieser chronischen Erkrankungen mit einer endothelialen Dysfunktion wurde von den Autoren diskutiert ¹⁴⁰.

Ein mit der TREND-Studie vergleichbares Patientenkollektiv wurde in der QUIET-Studie („QUinapril Ischemic Event Trial“) ebenso mit dem ACE-Hemmer Quinapril behandelt. Endpunkte stellten hier nun nicht die spezifischen Veränderungen an den Koronarien dar, sondern die Reduktion kardiovaskulärer ischämischer Ereignisse, sowie die angiographisch nachgewiesene Progressionsverzögerung der Koronarsklerose. Im Gesamtkollektiv ließ sich keine statistisch signifikante Verbesserung in der Verumgruppe belegen, jedoch zeigte die Auswertung der Untergruppen, dass bei Patienten mit LDL-Spiegeln >125 mg/dl die Endothelfunktion durch den Einsatz des ACE-Hemmers wirkungsvoll verbessert werden kann ^{142,143}.

In der SCAT-Studie („Simvastatin/Enalapril Coronary Atherosclerosis Trial“) wurden Patienten mit koronarer Herzkrankheit und einem durchschnittlichen LDL-Spiegel von 130mg/dl – wiederum ohne erhöhte Blutdruckwerte und normaler bis milde eingeschränkter linksventrikulärer Funktion – mit dem CSE-Hemmer Simvastatin, mit dem ACE-Hemmer Enalapril oder mit beiden kombiniert gegen die entsprechenden Placebogruppen behandelt. Ein Fortschreiten der Atherosklerose konnte nur in den mit dem Statin behandelten Patienten festgestellt werden. Die Behandlung mit dem ACE-Hemmer allein ergab keine Effekte ¹⁴⁴.

In der Zusammenschau kann also die Reduktion der Mortalität von Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen durch ACE-Hemmer, wie sie in der HOPE-Studie belegt wurde, nicht auf eine Reduktion der Atherosklerose selbst zurückgeführt werden, sondern vielmehr auf eine Senkung des Blutdrucks und eine Verbesserung der endothelialen Funktion.

1.6 Zielsetzung

Es sprechen also einige Punkte dafür, dass Angiotensin II und atherogene Low Density Lipoproteine ihre Wirkung wenigstens teilweise über die gleichen Signalwege vermitteln und sich hierbei gegenseitig verstärken können.

In der vorliegenden Arbeit soll nun diese Hypothese an kultivierten Gefäßmuskelnzellen und Mesangiumzellen hinsichtlich der Proliferation untersucht werden. Beide Zellen sind mesenchymalen Ursprungs und deshalb eng miteinander verwandt, jedoch sollen die Effekte sowohl an Gefäßzellen, als auch an spezifisch renalen Zellen untersucht werden.

Als Grundlage sollen Dosis-Wirkungs-Beziehungen für die isolierte Inkubation sowohl mit Angiotensin II, als auch mit atherogenen Lipoproteinen, hier v.a. den oxidierten LDL, aufgestellt werden. Die Beteiligung des AT₁-Rezeptors, über den die proliferationsfördernden Effekte vermittelt zu sein scheinen, soll hierbei durch spezifische Hemmung mit Losartan genauer charakterisiert werden.

Als Weiterführung sollen dann die Zellkulturen mit beiden Substanzen, Angiotensin II und atherogenen Lipoproteinen, gemeinsam inkubiert und die Proliferation gemessen werden.

Auf Proteinebene sollen hierbei die Angiotensin-Rezeptoren und ihre mögliche Expressionsdichte nach verschiedenen Inkubationen und in verschiedenen Zellkulturpassagen im Western Blot nachgewiesen werden.

Zur Spezifizierung der Interaktion von oxidierten Lipoproteinen mit der jeweiligen Zellkultur soll der LOX-1-Rezeptor auf Proteinebene im Western Blot dargestellt werden. Die Aufnahme der oxidierten LDL soll mittels einer Fluoreszenzmarkierung in der Histochemie veranschaulicht und mit Hilfe von Internalisierungsmessungen quantifiziert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Primärzellkultur

Für die Versuche in dieser Arbeit wurden sowohl erworbene Zellen (*Clonetics, Walkersville, USA*) verwendet, als auch Zellen aus den jeweiligen Geweben selbst präpariert. Dies war im Rahmen des Forschungsprojektes geplant und von der Ethikkommission genehmigt.

2.1.1 Menschliche Mesangialzellen (NHMC)

2.1.1.1 Präparation

Für die Präparation von Mesangiumzellen aus einer menschlichen Niere (NHMC = normal human mesangial cells) wurde der gesunde Pol einer Niere verwendet, die aufgrund eines Tumors entfernt werden musste. Dieser Teil der Niere ergab in der pathologischen Begutachtung keinen Hinweis auf ein tumoröses Geschehen.

Im Operationssaal wurde das Gewebestück in eiskaltes Transportmedium (RPMI 1640-Medium mit zugesetztem Penicillin, Streptomycin und L-Glutamin) aufgenommen und zur weiteren Aufarbeitung auf eine sterile Werkbank gebracht. Dort wurde in einer Petrischale die Nierenkapsel gelöst, die Nierenrinde präpariert und diese mit einem Skalpell in kleine Stücke zerkleinert. Nach erneuter Zugabe von Transportmedium wurden diese nun nacheinander durch Siebe verschiedener Porengröße (bis minimal 125 µm) gepresst, um schließlich die Glomeruli zu isolieren. Das Medium mit den Glomeruli wurde nun aufgenommen und zentrifugiert.

Das Zellpellet wurde zur Separation der Podozyten in Medium mit Kollagenase resuspendiert und für zehn Minuten bei 37°C inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde der Überstand mit den gelösten Podozyten abgetrennt und das Zellpellet der Mesangiumzellen in Kulturmedium (RPMI 1640-Medium mit 20% FCS und zugesetztem L-Glutamin, nichtessentiellen Aminosäuren, Natri-

umpyruvat, Insulin, Transferrin, Selenite, HEPES-Puffer, Penicillin und Streptomycin) resuspendiert und ausgesät.

2.1.1.2 Typisierung mittels Immunhistochemie

Zur Charakterisierung der gewonnenen Mesangialzellen wurden diese in der 6. Passage auf 24-well-plates ausgesät, und vor Erreichen eines konfluenten Monolayers fixiert. Hierfür wurden die Zellen einmal mit PBS/1% BSA gewaschen, und für jeweils fünf Minuten bei -20°C mit 80% Aceton/Ethanol, 80% Aceton und 50% Aceton fixiert. Nach weiteren drei Waschschrritten mit PBS/10% BSA konnten die Erstantikörper in PBS/1% BSA für eine Stunde zugegeben werden. Diese waren:

- Anti-Vimentin, ein Protein des Zellgerüsts von Zellen mesenchymalen Ursprungs, zur Abgrenzung gegen Zellen epithelialen Ursprungs (Maus-Antikörper, *DAKO, Hamburg, Deutschland*)
- Anti-Thy-1, ein spezifisches Oberflächenantigen, das v.a. an Mesangiumzellen exprimiert wird (Maus-Antikörper, *Chemicon, Temecula, USA*)
- Anti-von Willebrand-Faktor, dessen Vorhandensein auf den Mesangiumzellen nicht, wohl aber auf Endothelzellen, erwartet wurde, und somit als Kontrolle diente, dass nicht ein beliebiger Antikörper eine Positivfärbung auslöste (Maus-Antikörper, *DAKO, Hamburg, Deutschland*)
- Einem vierten Versuchsansatz wurde als Kontrolle kein Erstantikörper zugesetzt.

Nach drei Waschschrritten mit PBS/1% BSA wurde mit dem gegen Mausimmunglobulin gerichteten Horseradish-Peroxidase (HRP)-konjugierten Zweitantikörper (Ziegen-Antikörper, *DAKO, Hamburg, Deutschland*) in PBS/1% BSA für eine Stunde inkubiert und anschließend wiederum dreimalig mit PBS/1% BSA gewaschen.

Nach der Zugabe von Diaminbenzidin (DAB) als Substrat der HRP wurde die Braunfärbung als Ausdruck der Positivimmunfärbung unter dem Mikroskop be-

obachtet und DAB abgesaugt. Nach zweimaligem Waschen mit Aqua dest. konnten die Wells mit Glyceringelatine eingedeckt werden.

Hierbei wiesen die Zellen alle Merkmale von Mesangiumzellen auf, die Daten bzw. Fotos werden in dieser Arbeit nicht gezeigt.

2.1.1.3 Kultur

Die selbstpräparierten Mesangiumzellen wurden auf Kollagen Typ I - beschichteten Zellkulturmedien (BIOCOAT®, *BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland*) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert und bei Erreichen eines Monolayers im Verhältnis 1:5 gesplittet. Hierzu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mittels Trypsin und EDTA (2 min, 37 °C) und durch leichtes Klopfen an die Zellkulturflasche von der Unterlage gelöst und in Medium aufgenommen. Nach Abzentrifugieren der Zellen wurden diese wieder auf die jeweiligen Wells bzw. Versuchswells ausgesät.

Die gekauften Mesangiumzellen wurden nach Herstellerempfehlung auf unbeschichteten Zellkulturflaschen und in einem anderen Kulturmedium bei 37°C, 5% CO₂ gezüchtet (Basismedium MsBM mit 5% FCS und zugesetztem Gentamicin und Amphoterecin B). Sie konnten in einem Verhältnis von bis zu 1:7 geteilt werden.

2.1.2 Glatte Muskelzellen aus der Rinderaorta (BSMC)

2.1.2.1 Präparation

Zur Gewinnung der BSMC (bovine aortic smooth muscle cells) wurde das Aortenstück vom Schlachthof in eiskaltem Transportmedium (Medium 199 mit zugesetztem L-Glutamin, Penicillin und Streptomycin) ins Labor gebracht und dort auf einer sterilen Werkbank auf einer Präparationsunterlage von Fett- und Bindegewebe befreit, der Länge nach eröffnet und auf der Unterlage befestigt. Nach mehrmaligem Spülen der Tunica intima mit PBS wurden U-förmige Lappen bis in die Tunica media präpariert. Aus dieser Schicht, die vornehmlich aus glatten Muskelzellen besteht, wurden kleine Gewebstücke entnommen und in

Transportmedium gesammelt. Die Muskelschichtstücke wurden mit dem Skalpell weiter zerkleinert und auf Petrischalen gebracht. Zur Förderung des Anwachsens der Gewebstücke auf die Unterlage wurde nur sehr wenig Kulturmedium (Medium 199 mit 20% FCS und zugesetztem L-Glutamin, Penicillin und Streptomycin) zugesetzt und die Petrischalen für zwei Stunden bei 37°C und 5% CO₂ bebrütet. Anschließend wurde Kulturmedium im jeweiligen Volumen zugesetzt.

2.1.2.2 **Typisierung mittels Immunhistochemie**

Die Typisierung dieser gewonnenen Zellen erfolgte nach dem gleichen Versuchsprotokoll, wie für die Mesangiumzellen beschrieben. Als Erstantikörper wurden verwendet:

- Anti-SM-Actin, ein spezifisches Protein des kontraktilen Filamentsystems (Maus-Antikörper, *Progen, Wieblingen, Deutschland*)
- Anti-Desmin, ein Intermediärfilamentprotein von Skelett- und auch glatten Muskelzellen (Maus-Antikörper, *DAKO, Hamburg, Deutschland*)
- Anti-von Willebrand-Faktor, dessen Vorhandensein auch auf den glatten Muskelzellen nicht erwartet wurde, und somit wiederum als Kontrolle diente (Maus-Antikörper, *DAKO, Hamburg, Deutschland*)
- Ein vierter Versuchsansatz ohne Erstantikörper wurde erneut als Kontrolle verwendet.

Hier ließen sich die Zellen als glatte Muskelzellen charakterisieren, auch diese Daten bzw. Fotos werden in dieser Arbeit nicht gezeigt.

2.1.2.3 **Kultur**

Die selbstpräparierten Gefäßmuskelzellen konnten ebenso wie die gekauften Zellen auf unbeschichteten Kulturmedien bei 37°C, 5% CO₂ gezüchtet werden, jedoch wurde für diese nach Empfehlung des Herstellers ein anderes Kulturmedium verwendet (Basismedium SmBM mit 5% FCS und zugesetztem Insulin, humanem Fibroblastenwachstumsfaktor B (hFGF-B), humanem epidermalem Wachstumsfaktor (hEGF), Gentamicin und Amphoterecin B). Nach Ausbildung

eines Monolayers wurden die Zellen nach dem gleichem Protokoll wie dem der Mesangiumzellen gesplittet, die selbstpräparierten im Verhältnis 1:3, die gekauften bis zum Verhältnis 1:6.

2.2 Proliferationsnachweis

Zum Nachweis einer gesteigerten Proliferation der einzelnen Zellkulturen kam sowohl ein Assay auf der Basis des Einbaus von radioaktiv markiertem Thymidin in neu synthetisierte DNA, als auch eine nichtradioaktive Methodik, die auf der Umwandlung von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazoliumbromid (MTT) in photometrisch messbares Formazan als Ausdruck der Proliferation beruht, zur Anwendung.

2.2.1 ³H-Thymidin-Einbau

Mesangialzellen wurden mit 1×10^5 Zellen der 7. bis 9. Passage auf 6cm-Petrischalen ausgesät, für insgesamt 48 Stunden inkubiert, wovon die letzten 12 Stunden in Anwesenheit von ³H-Thymidin erfolgten. Glatte Muskelzellen wurden mit 2×10^5 Zellen der 6. bis 8. Passage ausgesät und für insgesamt 23 Stunden, davon 7 Stunden mit ³H-Thymidin, inkubiert. Soweit nicht anders angegeben, bestand bei drei Versuchsansätzen sowohl die Kontrolle, als auch die Inkubationsansätze in den jeweiligen Konzentrationen, aus serumfreiem Medium. Anschließend wurden die Zellen mittels Trypsin/EDTA abgelöst und bei 4°C und 1000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in Lysepuffer mit Proteinase K aufgenommen, über Nacht bei 56°C unter Schütteln lysiert und 15 Minuten bei 15000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, die DNA mittels Phenol und Chloroform extrahiert, durch Isopropanol gefällt und wieder in TE-Puffer gelöst.

Die absolute DNA-Menge wurde photometrisch bestimmt (*Perkin Elmer, Wellesley, USA*), die radioaktive Aktivität im β -Counter (*Canberra-Packard, Dreieich, Deutschland*) als counts per minute (cpm) gezählt. Diese Werte wurden als cpm pro μg DNA aufeinander bezogen.

2.2.2 MTT-Assay

Für den Proliferationsassay mit Hilfe von MTT (MTT-Proliferation Kit I, *Roche, Mannheim, Deutschland*) wurden 7×10^3 Zellen NHMC der 5. bis 8. Passage bzw. 1×10^4 Zellen BSMC der 6. bis 8. Passage auf 96-well-plates ausgesät, wobei die Mesangialzellen für 48 Stunden inkubiert wurden, die glatten Muskelzellen lediglich 24 Stunden. Soweit nicht anders angegeben, bestand bei 12 Versuchsansätzen sowohl die Kontrolle, als auch die Inkubationsansätze in den jeweiligen Konzentrationen, aus Kulturmedium mit 1% FCS.

Nach Herstellerangabe wurden den Zellen „MTT-solution“ für vier Stunden und „solubilization-solution“ über Nacht jeweils bei 37°C zugegeben und die Absorption im Photometer bei 570 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 700 nm gemessen.

2.2.3 Auswertung und Statistik

Sowohl im Proliferationsassay mit ^3H -Thymidin-Einbau als auch im MTT-Assay wurde die Kontrolle als 100% Proliferation gesetzt und die jeweils gemittelten Versuchsansätze auf diesen Wert bezogen. Hieraus wurden Säulendiagramme erstellt und die Standardabweichung (SEM) wurde positiv mit dargestellt.

Das Signifikanzniveau wurde, soweit nicht anders angegeben, mittels einseitigem gepaartem T-Test bestimmt, wobei ein Wert von $p \leq 0,05$ (*) als signifikant anzusehen war, Werte von $p \leq 0,001$ (**) und $p \leq 0,0001$ (***) Ausdruck einer hohen Signifikanz waren.

2.3 Western Blot

Zur Darstellung von verschiedenen Rezeptoren auf Proteinebene wurden sowohl NHMC und BSMC verwendet, als auch HUVEC (humane Umbilicalvenen Endothelzellen) und die Zelllinie HBMEC (Mikrovaskuläre Endothelzellen aus dem menschlichen Gehirn) als Referenzzellen.

2.3.1 Versuchsdurchführung

Zur Darstellung der AT₁- und AT₂-Rezeptordichte nach Stimulation mit verschiedenen Substanzen wurden NHMC auf 75cm² Zellkulturflaschen mit diesen in serumfreiem Medium für 24 Stunden inkubiert. Danach wurden sie auf Eis in hypotonem Lysepuffer aufgenommen, die DNA durch mehrmaliges Durchpressen durch eine Kanüle geschert. Ein Teil davon wurde im Verhältnis 3:2 mit 0,3M NaOH versetzt und nach fünf Minuten bei 95°C einer Proteinbestimmung nach Lowry ¹⁴⁵ zugeführt (Protein-Assay-Kit, *Sigma, Deisenhofen, Deutschland*). Der andere Teil wurde ebenfalls 3:2 mit Probenpuffer gemischt und für fünf Minuten bei 95°C unter Schütteln gekocht.

Gleiche Mengen an Protein wurden auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen und bei 40 bis 80mA getrennt. Nach Abtrennen des Sammelgels wurden die Proteine in 90 Minuten bei 2A auf eine mit Methanol gewaschene PVDF-Membran übertragen.

Über Nacht wurden in Blotto unspezifische Bindungen blockiert. Der Primärantikörper wurde in Blotto verdünnt für eine Stunde auf der Membran belassen. Nach viermaligem Waschen mit TBS-T wurde die Membran mit dem entsprechenden HRP-konjugierten Zweitantikörper überschichtet. Nach weiteren vier Waschschrritten wurden die immungefärbten Banden mithilfe von ECL (ECL-Plus Detection Kit, *Amersham, Deutschland*) entwickelt und auf Photofilme (*Fuji, Tokyo, Japan*) belichtet.

Als Antikörper wurden verwendet:

- Anti-AT₁-Rezeptor (Kaninchen-Antikörper, *Santa Cruz, California, USA*)
- Anti-AT₂-Rezeptor (Ziegen-Antikörper, *Santa Cruz, California, USA*)
- Anti-Actin (Maus-Antikörper, *Santa Cruz, California, USA*)

- Anti-LOX-1-Rezeptor (selbsthergestellt durch Immunisierung von Kaninchen mit der LOX-1 Peptidsequenz H₂N-CQKKANLRAQ-COOH, AS 264-273¹²⁹)
- Anti-Kaninchenimmunglobulin-HRP (Schwein-Antikörper, *DAKO, Hamburg, Deutschland*)
- Anti-Ziegenimmunglobulin-HRP (Esel-Antikörper, *Santa Cruz, California, USA*)
- Anti-Mausimmunglobulin-HRP (Ziegen-Antikörper, *DAKO, Hamburg, Deutschland*)

2.3.2 Auswertung und Statistik

Die Western Blot-Banden wurden densitometrisch ausgewertet („Quantity One“, *BioRad, München, Deutschland*) und als Säulendiagramme mit der Standardabweichung dargestellt. Zusätzlich zum Proteinabgleich mittels Proteinbestimmung wurden die Membranen mit Anti-β-Actin als Referenzprotein gefärbt, um eine gleichmäßige Proteinbeladung zu verifizieren (Daten nicht gezeigt).

Bei den NHMC-Versuchen zur Rezeptordichtestimulation wurde die Intensität der Kontrollzellen als 100% gesetzt, und die jeweiligen Intensitäten der Inkubationen darauf bezogen. Diese Daten wurden einer Signifikanzprüfung durch einen zweiseitigen gepaarten T-Test unterzogen. Bei den Versuchen zum Vergleich der Expression in verschiedenen Passagen wurde die Intensität der BSMC in der 7. Passage als 100% gesetzt. Auch in die Auswertung der Western Blots zum Vergleich der Rezeptorexpressionen in unterschiedlichen Primärzellen bzw. der Zelllinie HBMEC, ging die Intensität der BSMC als 100% mit ein.

2.4 Histochemie – Dil-oxLDL-Interaktion

Zur Veranschaulichung der Interaktion von oxidierten Lipoproteinen mit den inkubierten Zellen wurde oxLDL verwendet, das mit 3,3'-Dioctadecylindocarbocyanin (Dil) markiert war, im folgenden Dil-oxLDL genannt.

BSMC wurden mit 1×10^5 Zellen auf 6-well-plates, in denen ein Deckgläschen lag, ausgesät. Bevor sich ein konfluenten Monolayer gebildet hatte, wurden die Zellen mit den verschiedenen Konzentrationen von Dil-oxLDL inkubiert. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Deckgläschen herausgenommen, zweimal mit PBS gewaschen, und die Zellen auf ihnen mit PBS/4% Paraformaldehyd fixiert. Nach weiterem zweimaligen Waschen mit Aqua dest. wurden die Deckgläschen auf einem Objektträger mit Mowiol 4-88 eingedeckt.

Am Fluoreszenzmikroskop (*Zeiss, Jena, Deutschland*) wurden die Zellen mit einer konstanten Belichtungszeit von 30 Sekunden sowohl in der 40-fachen Vergrößerung als auch in der 63-fachen Vergrößerung fotografiert.

2.5 Dil-oxLDL-Internalisierung – fluorometrische Bestimmung

Zur weiteren Spezifizierung der Interaktion von oxLDL mit den Zellen wurde die Dil-oxLDL-Internalisierung gemessen.

2.5.1 Versuchsdurchführung

Hierzu wurden 3×10^5 Zellen NHMC auf 6-well-plates ausgesät und pro Versuchsansatz drei Wells mit den verschiedenen Konzentrationen Dil-oxLDL in 1% FCS inkubiert. Nach 14 bzw. 24 Stunden wurden die Zellen auf Eis zweimal mit PBS gewaschen und in Lysepuffer aufgenommen. Wie zum Western Blot wurde ein Teil mit 0,3M NaOH versetzt, fünf Minuten bei 95°C gekocht und der Proteinbestimmung nach Lowry¹⁴⁵ zugeführt. Der andere Teil wurde im Verhältnis 5:1 mit Isopropanol gemischt und für 15 Minuten bei 37°C im Schüttler inkubiert. Nach Zentrifugation für 15 Minuten bei 3000 x g wurde der Überstand dekantiert.

Im Fluoreszenzspektrometer (*Perkin Elmer, Wellesley, USA*) wurde bei einer Anregungswellenlänge von 550 nm im Überstand die Fluoreszenz bei einer emittierten Wellenlänge von 565 nm gemessen. Diese Werte wurden auf die Werte einer Standardkurve bezogen, die mit bekannter Dil-oxLDL-Konzentration im Fluoreszenzspektrometer gemessen wurden.

2.5.2 Auswertung und Statistik

Mit Hilfe von Standardkurven sowohl für die Proteinbestimmung, als auch für die Konzentrationsbestimmung von Dil-oxLDL, konnten die Werte bestimmt und in ng Dil-oxLDL pro μg Protein als Mittelwert der Dreifachbestimmungen aufeinander bezogen werden. Aus den Mittelwerten wurden Säulendiagramme erstellt, die Standardabweichung als positive Balken mit angezeigt.

Zur Ermittlung des Signifikanzniveaus wurden die Werte einem einseitigen gepaarten T-Test unterzogen, mit Bezug der jeweiligen Konzentration auf 5 $\mu\text{g/ml}$ Dil-oxLDL pro Inkubationsdauer. Hierbei waren wiederum Werte von $p \leq 0,05$ (*) bzw. von $p \leq 0,001$ (**) Ausdruck der Signifikanz.

2.6 Präparation der Lipoproteine

Die Präparation von Lipoproteinen, insbesondere der LDL und ihrer oxidativen Modifizierung, ist eine standardisierte Prozedur, die nach einer Veröffentlichung der Laborleiter durchgeführt wird ¹⁴⁶.

2.6.1 Low Density Lipoproteine (LDL)

Gepooltem Plasma von gesunden Blutspendern wurden sofort 2 mM EDTA zur Verhinderung einer Autooxidation, als Proteinaseinhibitor 10000 Kallikrein-Inaktivator Einheiten Aprotinin und als antimikrobielle Behandlung 16 mg/l Gentamicin und 80 mg/l Chloramphenicol zugesetzt.

Nach Dichteeinstellung mit Hilfe von KBr auf 1,063 wurden die Plasmalipoproteine durch sequentielle Ultrazentrifugation (Beckmann, Vti 50 Rotor) mit

200000 x g bei 4°C für 8 Stunden getrennt. Hierdurch wurden zuerst die HDL unterhalb des Puffers abgetrennt, LDL, VLDL, Chylomikronen und Triglyceride befanden sich im Überstand. Dieser wurde dekantiert und nach erneuter Einstellung der Dichte auf 1,063 mit KBr einem zweiten Zentrifugationsschritt zugeführt. Hier wurden bei 20000 x g und 4°C in drei Stunden die einzelnen Fraktionen aufgespalten, wobei sich LDL in der Mitte des Zentrifugenröhrchens sammelte.

Diese Schicht wurde gewonnen, durch Filter unterschiedlicher Porengröße steril filtriert, und mittels einer Dialyse gegen PBS mit zugesetztem 200 µM EDTA als Oxidationsschutz bei 4°C für 48 Stunden von den zugesetzten Salzen befreit. Diese LDL-Lösung wurde für drei Wochen unter Lichtabschluss bei 4°C gelagert.

2.6.2 Oxidation der LDL

Zur Oxidation der nativen LDL wurde die LDL-Lösung zuerst gegen PBS mit zugesetztem 1µM EDTA bei 4°C mit zweimaligem Pufferwechsel für 72 Stunden dialysiert, um das EDTA als Oxidationshemmer weitgehend zu entfernen. Nach Bestimmung der Lipoproteinkonzentration¹⁴⁵ wurde die Lösung auf 1mg/ml LDL eingestellt und mit Hilfe einer nächsten Dialyse bei Raumtemperatur für 40 Stunden gegen einen Kalium-Phosphat-Puffer, in dem CuSO₄ als Oxidationsmittel zugesetzt war, oxidiert. Zur Beendigung dieser Oxidation wurde 10µM EDTA zugegeben. Ein letzter Dialyseschritt gegen CuSO₄-freies Dialysat konnte diese Substanz wieder entfernen.

Die so gewonnene oxLDL-Lösung wurde wiederum steril filtriert, ihr Proteingehalt bestimmt¹⁴⁵ und ebenfalls für drei Wochen in Dunkelheit bei 4°C gelagert.

Der Oxidationsgrad der oxLDL wurde mittels einer Lipidelektrophorese (Lipidophor®, *Immuno, Wien, Österreich*) ermittelt. Grundlage hierfür ist die im Vergleich zu nativen LDL stärker negative Ladung, was zu einem beschleunigten Laufverhalten im Agarose-Gel führt¹⁴⁷. Im Vergleich zu standardisierten Mobilitätswerten für native LDL zeigten die oxidativ veränderten LDL eine 2,0 bis 2,3-fache Beschleunigung.

2.6.3 Fluoreszenzmarkierung der oxidierten LDL

Um die oxidierten LDL mit dem fluoreszierenden Farbstoff 3,3'-Diocetylindocarbocyanin (Dil) zu markieren, wurde eine Methode nach Stephan und Yurachek angewandt ¹⁴⁸. Hier wurden 300 µg des Farbstoffs pro mg oxLDL-Protein der Lösung zugesetzt und diese für 18 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Dichte mit KBr auf 1,3 eingestellt und die wirklich markierte Dil-oxLDL-Fraktion mittels einer Ultrazentrifugation für drei Stunden bei 20000 x g bei 12 °C von den übrigen Bestandteilen getrennt. Diese Bande wurde gewonnen und gegen PBS für 48 Stunden zur Entfernung der zugefügten Salze dialysiert.

Nach Passage durch einen Sterilfilter und Bestimmung der Lipoproteinkonzentration ¹⁴⁵ wurde die Dil-oxLDL-Lösung für drei Wochen unter strengem Lichtabschluss bei 4°C gelagert.

2.7 Material

2.7.1 Substanzen

Folgende Substanzen von den einzelnen Herstellern wurden verwendet:

Amersham Biosciences, Braunschweig, Deutschland:

ACS II (Szintillationsflüssigkeit), ECL Plus Detection Kit, PVDF-Membran, ³H-Thymidin

Biochrom, Berlin, Deutschland:

Fötales Kälber Serum (FCS), L-Glutamin, Natriumpyruvat, nichtessentielle Aminosäuren (NEA), Penicillin/Streptomycin, RPMI 1640, Trypsin/EDTA,

Boehringer, Mannheim, Deutschland:

Chloramphenicol, Kollagenase A, Insulin, Selenite, Transferrin

Calbiochem, Schwalbach, Deutschland:

Mowiol 4-88

Chemicon, Temecula, USA:

Anti-Thy-1

Cell Systems, St. Katharinen, Deutschland:

Medium MsBM, Medium SmBM, FCS, Gentamicin, Amphoterecin B, Insulin, humaner Fibroblastenwachstumsfaktor B (hFGF-B), humaner epidermaler Wachstumsfaktor (hEGF)

DAKO, Hamburg, Deutschland:

Anti-Vimentin, Anti-Desmin, Anti-Faktor VII, Anti-Mausimmunglobulin-HRP, Anti-Kaninchenimmunglobulin-HRP

Dupont Merck & Co, Wilmington, USA:

2-n-butyl-4chloro-hydroxymethyl-1-[(2'-(1H-tetrazol-5-yl)-biphenyl-4-yl)-methyl] Imidazol (Losartan)

Fuji Photo Film Co., Tokyo, Japan:

Medizinische Röntgenfilme

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland:

SeeBlue, SeeBlue 2 (Proteinstandards)

Merck, Darmstadt, Deutschland:

Bromphenolblau, Calciumchlorid (CaCl_2), Gentamicin, Glycerin, Glyceringelatine, Kaliumbromid (KBr), Kaliumchlorid (KCl), Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4), Kupfersulfat (CuSO_4), Natriumchlorid (NaCl), Paraformaldehyd (PFA), Salzsäure (HCl), Sodiumdodecylsulfat (SDS), Tris

Molecular Probes, Leiden, Niederlande:
3,3'-Diocetadecylindocarbocyanin (DiI)

PAA Laboratories, Linz, Österreich:
Phosphate buffered Saline (PBS)

Progen, Wieblingen, Deutschland:
Anti-SM-Actin

Roche, Mannheim, Deutschland:
Complete mini (Proteinase-Inhibitor), MTT-Proliferation Kit

Santa Cruz, California, USA:
Anti-AT₁-Rezeptor, Anti-AT₂-Rezeptor, Anti-Actin, Anti-Ziegenimmunglobulin-HRP

Sigma Aldrich, München, Deutschland:
Angiotensin II, Aprotinin, Bovines Serumalbumin (BSA), Chloroform, Diaminbenzidin (DAB), Ethylendiamintetraacetat (EDTA), HEPES-Puffer (N-[2-Hydroxyethyl]-Piperazine-N-[2-ethanesulfonic-acid]), Isopropanol, Medium 199, β-Mercaptoethanol, Phenol, Proteinassay Kit nach Lowry, Proteinase K, Sucrose, Tween 20

2.7.2 Lösungen

Lysepuffer für ³H-Thymidin-Einbau:

50 mM Tris/HCl pH 8,0, 1mM EDTA, 20 mM NaCl, 1% SDS, 500 µg/ml Proteinase K

TE-Puffer für ³H-Thymidin-Einbau:

10 mM Tris/HCl pH 7,4, 1mM EDTA

Lysepuffer für Western Blot:

10 mM HEPES, 10 mM KCl, 15 mM EDTA, 100 mM Sucrose, 1% Triton X-100, pH 7,4, Proteinase Inhibitor „Complete mini“

Probenpuffer:

0,2 M Tris, 6% SDS, 15% Glycerin, pH 6,7, Bromphenolblau, 10% β-Mercaptoethanol

Blotto:

3% fettfreie Trockenmilch in TBS-T

TBS-T:

20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20

Lysepuffer zur fluorometrischen Dil-oxLDL-Messung:

50 mM HEPES, 50 mM NaCl, 20 mM EDTA, pH 7,5, 1% Triton X-100, Proteinaseinhibitor „Complete mini“

3 Ergebnisse

3.1 Proliferationsnachweis mittels ^3H -Einbau in BSMC

Zu Beginn soll die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen durch Tritium-Assays dargestellt werden.

3.1.1 Proliferation durch FCS

Mit Hilfe von verschiedenen Konzentrationen von FCS wurde die Methodik etabliert, um eine signifikante Steigerung der Proliferation der kultivierten Zellen nachweisen zu können. So zeigten BSMC nach insgesamt 23 Stunden Inkubation mit 2%, 10% und 20% FCS, wobei die letzten 7 Stunden ^3H -Thymidin zugesetzt war, eine signifikante Steigerung der Proliferationsrate um das fünf- bzw. neunfache gegenüber den Kontrollzellen ohne FCS (*Abb.1*).

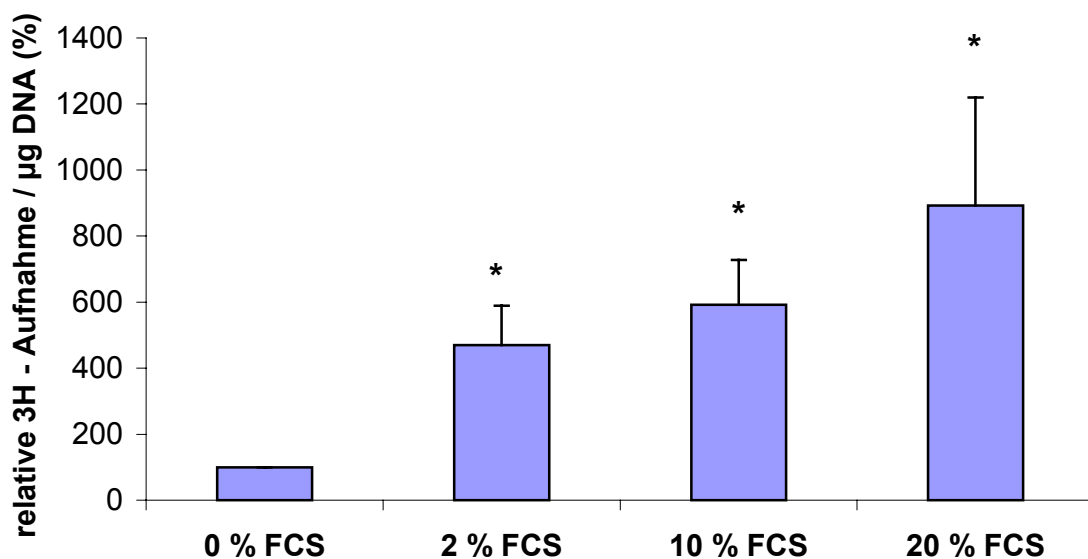


Abb.1: Gesteigerte relative ^3H -Thymidin-Aufnahme pro μg DNA als Ausdruck der erhöhten Proliferationsrate von BSMC durch Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von FCS.

Die Säulen stellen die Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen von $n = 5$ unabhängigen Versuchen \pm SEM dar.

3.1.2 Angiotensin II

Nachdem für glatte Muskelzellen und Mesangialzellen bereits eine gesteigerte Proliferation durch Angiotensin II gezeigt werden konnte^{72,78}, sollte diese als Basis für die kombinierte Inkubation mit oxLDL nachgewiesen werden.

Jedoch ließ sich unter den vorliegenden Versuchsbedingungen dieser Effekt bei Angiotensin II-Konzentrationen von 1 nM bis 1 µM nicht nachvollziehen. Auch eine spezifische Hemmung des AT₁-Rezeptors durch 1 µM Losartan, der als verantwortlich für die proliferationssteigernden Effekte durch Angiotensin II identifiziert wurde⁷², erbrachte keine signifikante Veränderung der Proliferation im Vergleich zu den Kontrollzellen.

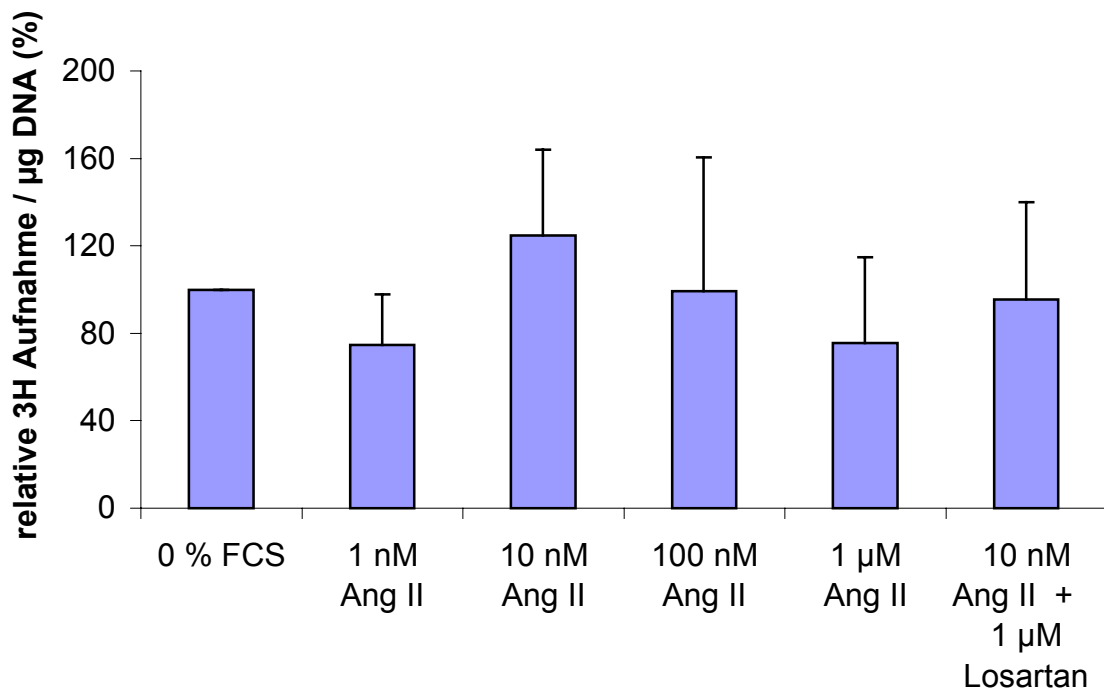


Abb.2: Unveränderte relative ³H-Thymidin-Aufnahme pro µg DNA von BSMC durch Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Angiotensin II und spezifischer Hemmung des AT₁-Rezeptors mit 10 µM Losartan.

Die Säulen stellen die Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen von $n = 9$ unabhängigen Versuchen \pm SEM dar. Die Prüfung mittels zweiseitigem gepaartem T-Test erbrachte keine Signifikanzen.

3.1.3 Lipoproteine

Ebenso wurde die Wirkung von verschiedenen Konzentrationen nativer (5µg/ml, 10µg/ml, 50µg/ml) und oxidierter LDL (5µg/ml, 10µg/ml, 20µg/ml) auf das Wachstumsverhalten von BSMC untersucht. Für Endothelzellen konnte ein steigernder Effekt in der Arbeitsgruppe des Laborleiters bereits nachgewiesen werden ¹¹⁶, ebenso für Myozyten ¹¹⁸ und Mesangialzellen ¹¹⁹.

In unserer Versuchsdurchführung konnte eine dosisabhängige Proliferationssteigerung bis auf maximal das fünffache gegenüber der Kontrolle nachgewiesen werden, eine weitere Erhöhung der LDL-Konzentration erbrachte einen erneuten Abfall dieser Proliferation. Der Inkubationsansatz mit 50µg/ml oxLDL wurde bei stark eingeschränkter Proliferation, bzw. toxischer Schädigung ^{94,125} der Zellen durch eine Konzentration von 20µg/ml oxLDL ersetzt.

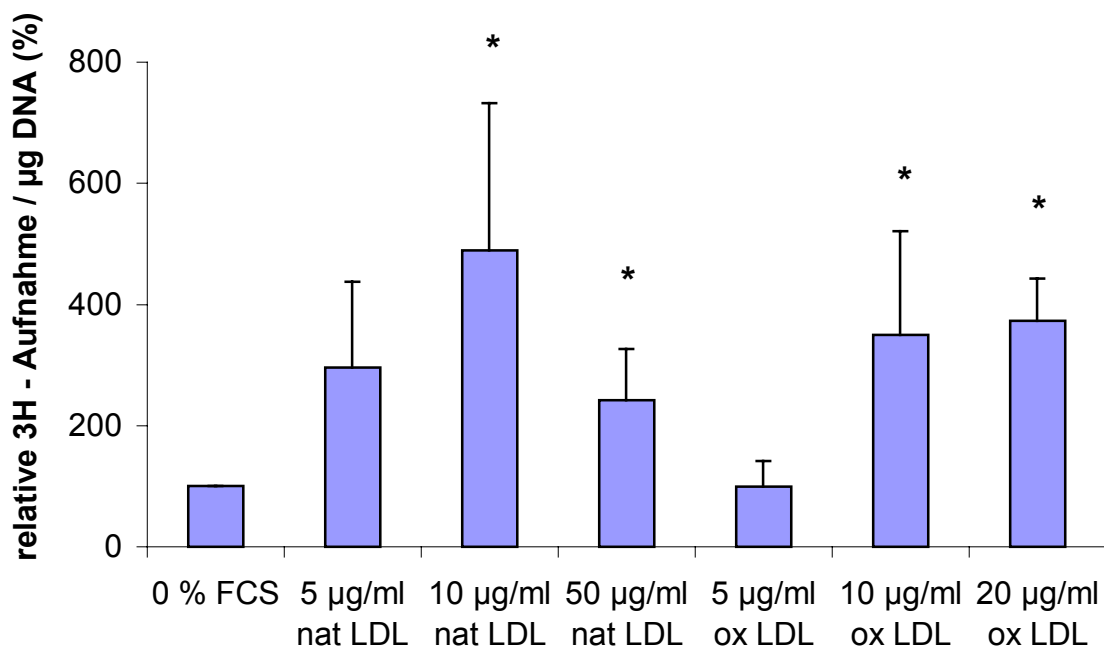


Abb.3: Gesteigerte relative ³H-Thymidin-Aufnahme pro µg DNA als Ausdruck der erhöhten Proliferationsrate von BSMC durch Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von nativen und oxidierten LDL.

Die Säulen stellen die Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen von n = 4 unabhängigen Versuchen ± SEM dar.

3.1.4 Angiotensin II und Lipoproteine

Eine Potenzierung der Effekte der jeweiligen Einzelsubstanzen konnte bereits nachgewiesen werden ¹⁰³, weshalb hier die kombinierte Inkubation von Angiotensin II und LDL auf Proliferationsebene untersucht werden sollte.

Mit $n = 3$ wurden nur wenige Versuche durchgeführt, es zeigen sich abgesehen von den hohen Standardabweichungen sehr uneinheitliche Ergebnisse in den verschiedenen Versuchsansätzen. So ist eine Versechsfachung der Proliferation bei 5 $\mu\text{g/ml}$ oxLDL und 100 nM Angiotensin II wohl sehr kritisch zu sehen, wenn die gleiche Angiotensin II-Konzentration bei einer gesteigerten Proliferation durch 10 $\mu\text{g/ml}$ native bzw. oxidierte LDL zu einer Hemmung derselben führt.

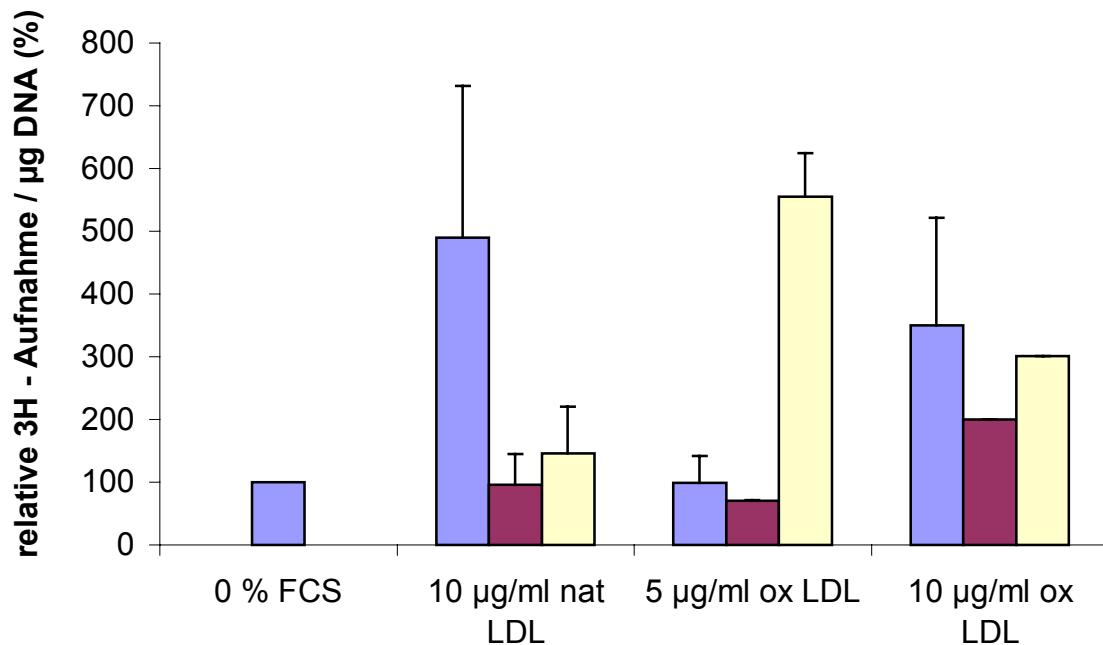


Abb.4: Relative ³H-Thymidin-Aufnahme pro μg DNA als Ausdruck der Proliferation von BSMC durch Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von LDL (graue Säulen) und Kombination dieser mit 10 nM Angiotensin II (schwarze Säulen) bzw. 100 nM Angiotensin II (weiße Säulen).

Die Säulen stellen die Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen von $n = 3$ unabhängigen Versuchen \pm SEM dar. Im zweiseitigen gepaarten T-Test konnten keine Signifikanzen errechnet werden.

3.2 Proliferationsnachweis mittels ^3H -Einbau in NHMC

Auch in menschlichen Mesangialzellen wurden die Proliferationsassays mit ^3H -Thymidin durchgeführt, um die Effekte der verschiedenen Substanzen zu untersuchen.

3.2.1 Proliferation durch FCS

Die Methodik wurde auch in diesen Primärzellkulturen mit Hilfe von verschiedenen Konzentrationen von FCS etabliert, um signifikante Veränderungen der Proliferationsrate erfassen zu können. Es zeigte sich wiederum eine um das drei- bis sechsfache gegenüber der Kontrolle ohne FCS gesteigerte Proliferationsrate durch 2% bzw. 5% FCS. Hier wurde jedoch bei insgesamt langsamerem Wachstum der NHMC – verglichen mit den BSMC – eine Inkubationszeit von 48 Stunden gewählt, wobei hier die letzten 12 Stunden in Anwesenheit von ^3H -Thymidin erfolgten.

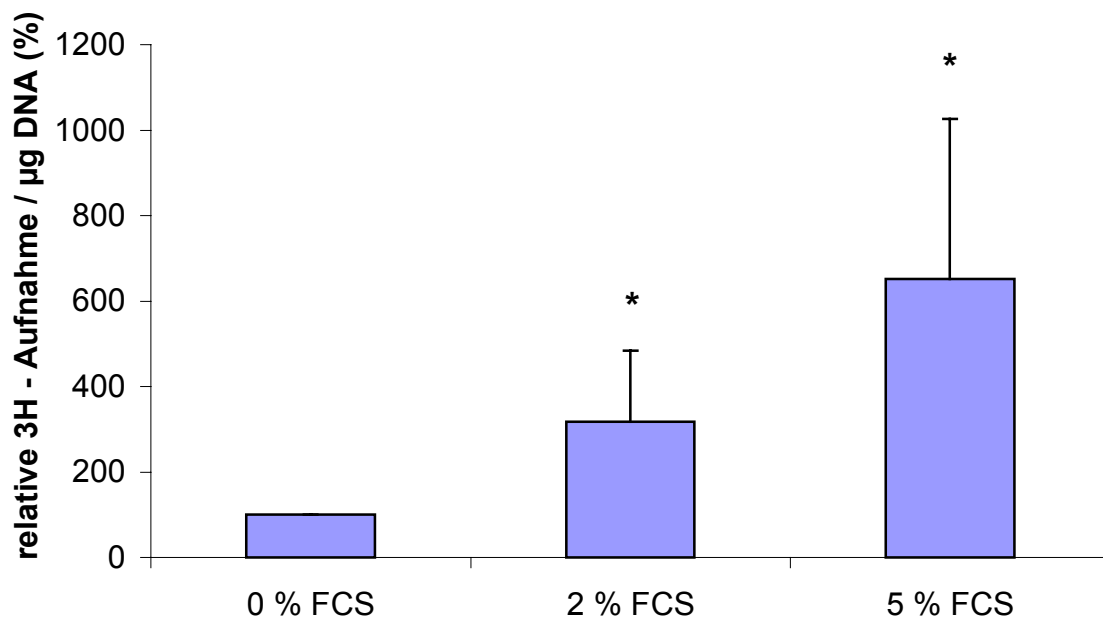


Abb.5: Gesteigerte relative ^3H -Thymidin-Aufnahme pro μg DNA als Ausdruck der erhöhten Proliferationsrate von NHMC durch Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von FCS.

Die Säulen stellen die Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen von $n = 5$ unabhängigen Versuchen \pm SEM dar.

3.2.2 Angiotensin II

Wie schon erwähnt, war eine Steigerung der Proliferation durch Angiotensin II in verschiedenen Konzentrationen bereits für verschiedene Zellen gezeigt, unter anderem auch für die Mesangiumzellen⁷⁸. Folglich sollte das Proliferationsverhalten auf Inkubation mit diesen Konzentrationen die Grundlage für die nachfolgenden Versuche darstellen.

Jedoch konnte – wie schon bei den BSMC – bei hohen Standardabweichungen keine Veränderung der Proliferation im Vergleich zu den Kontrollzellen durch die einzelnen Angiotensin II-Konzentrationen (1 nM bis 100 nM) nachgewiesen werden. Ebenso blieb die spezifische Hemmung des AT₁-Rezeptors durch 1 µM Losartan ohne signifikanten Effekt.

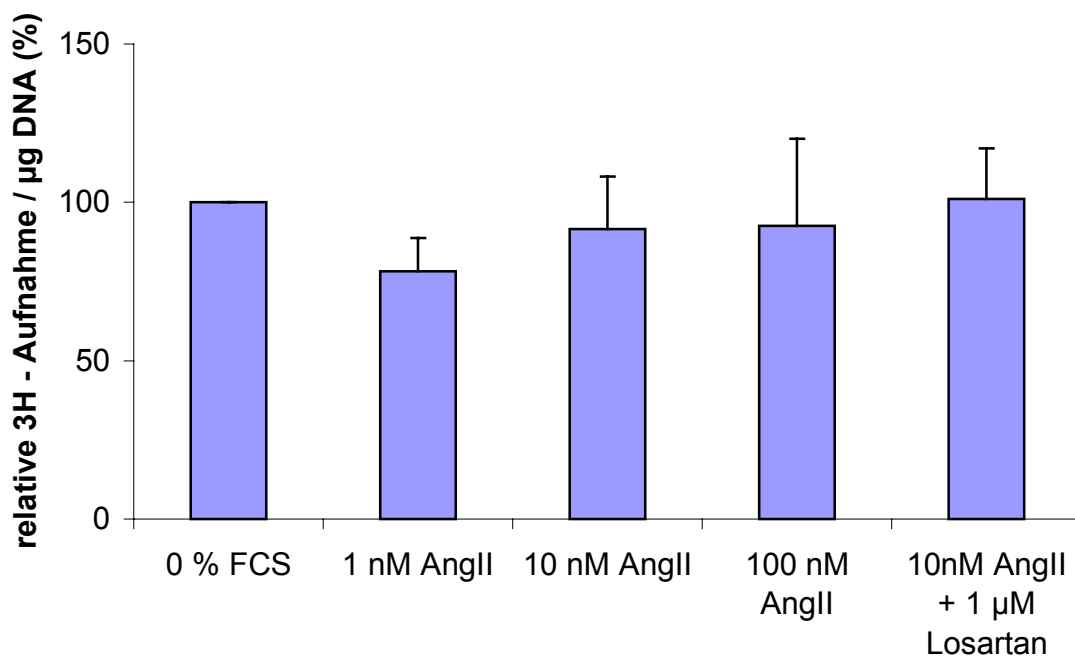


Abb.6: Unveränderte relative ³H-Thymidin-Aufnahme pro µg DNA von NHMC durch Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Angiotensin II und spezifischer Hemmung des AT₁-Rezeptors mit 10 µM Losartan.

Die Säulen stellen die Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen von $n = 3$ unabhängigen Versuchen \pm SEM dar. Die Prüfung mittels zweiseitigem gepaartem T-Test ergab keine Signifikanzen.

3.2.3 Lipoproteine

Auch NHMC wurden mit verschiedenen Konzentrationen nativer LDL (5µg/ml, 10µg/ml, 50µg/ml) und 3µg/ml oxidierter LDL untersucht. Der bereits nachgewiesene Effekt ¹¹⁹ sollte somit auch in unserem Versuchsansatz bestätigt werden.

So konnte eine im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikante Steigerung der Proliferation bis auf ca. 140 % bei 3 µg/ml und 10 µg/ml natLDL gefunden werden. Wie bereits in den Versuchen zuvor, ergaben sich teilweise sehr hohe Standardabweichungen als Ausdruck von großen Schwankungen in den einzelnen Ansätzen. So zeigte sich zwar bei 3µg/ml oxLDL eine deutlich erhöhte mittlere Proliferation von 185 %, jedoch erreichte dieser Wert bei n = 2 kein Signifikanzniveau. Der Versuchsansatz mit 30 µg/ml oxLDL zeigte neben einer verminderten Proliferation bereits eine toxische Schädigung der Zellen.

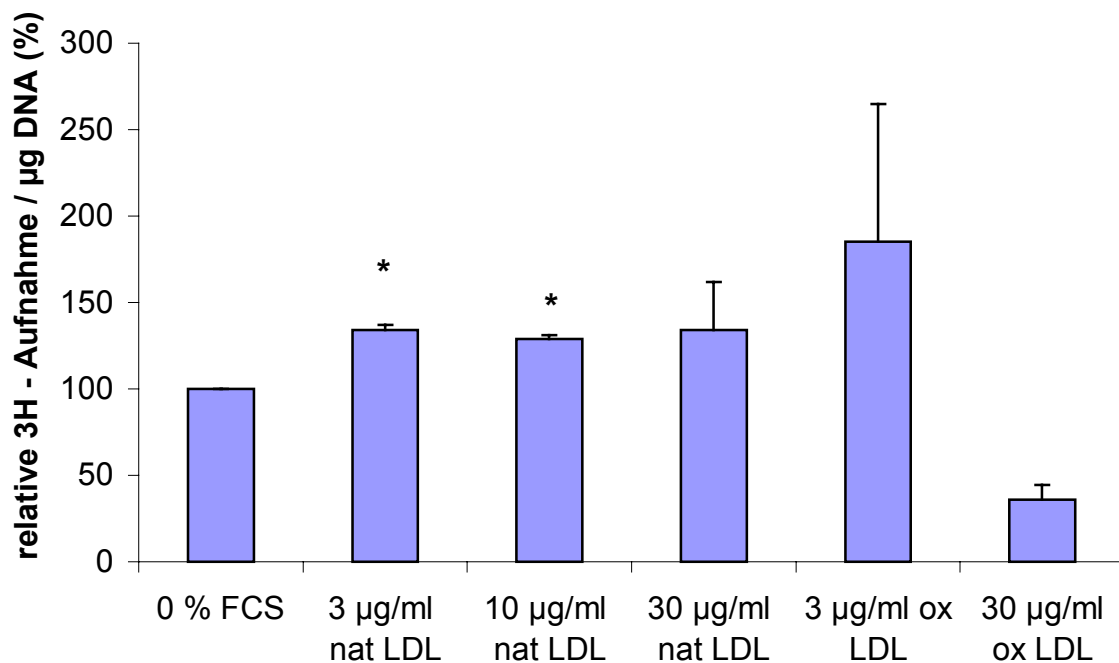


Abb.7: Gesteigerte relative ³H-Thymidin-Aufnahme pro µg DNA als Ausdruck der erhöhten Proliferationsrate von NHMC durch Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von nativen und oxidierten LDL.

Die Säulen stellen die Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen von n = 2 unabhängigen Versuchen ± SEM dar.

3.2.4 Angiotensin II und Lipoproteine

Die Hypothese, dass die Kombination von Angiotensin II und Lipoproteinen die Summe der Einzeleffekte potenzieren könnte, wie sich aus dem bisher Veröffentlichten vermuten ließ (siehe 1.5.), sollte hier untersucht werden. So wurde den jeweiligen LDL-Ansätzen sowohl 10 nM Angiotensin II als auch 100 nM Angiotensin II zugegeben.

Auch hier zeigte sich das Problem der großen Schwankungen in den einzelnen Versuchsansätzen, so dass die Ergebnisse insgesamt sehr uneinheitlich ausfielen, und ein Erreichen eines Signifikanzniveaus hierdurch verhindert wurde. Dennoch zeigte sich wie bei den BSMC die Tendenz, dass die Proliferation von mit 3 µg/ml sowohl nativen als auch oxidierten LDL inkubierten NHMC durch die Zugabe von 100 nM Angiotensin II gehemmt wurde.

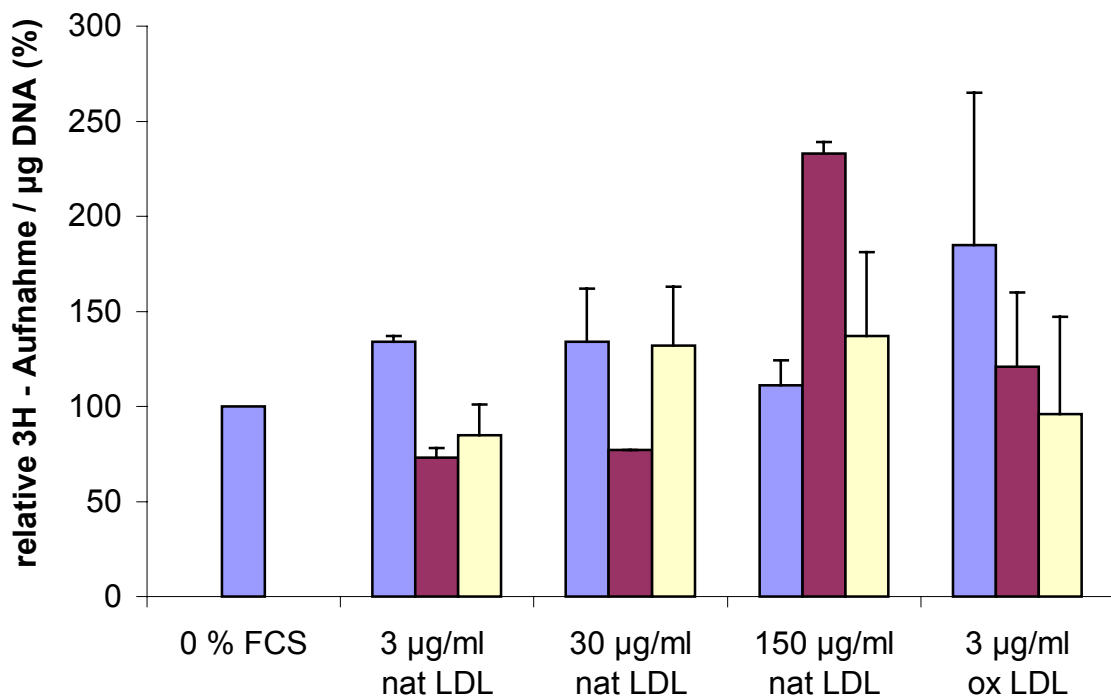


Abb.8: Relative ^3H -Thymidin-Aufnahme pro μg DNA als Ausdruck der Proliferation von NHMC durch Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von LDL (graue Säulen) und Kombination dieser mit 10 nM Angiotensin II (schwarze Säulen) bzw. 100 nM Angiotensin II (weiße Säulen).

Die Säulen stellen die Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen von $n = 2$ unabhängigen Versuchen \pm SEM dar. Im zweiseitigen gepaarten T-Test konnten keine Signifikanzen errechnet werden.

3.3 Proliferationsnachweis mittels MTT-Assay in BSMC

Nachdem in den Versuchslabors parallel zum ^3H -Thymidin-Einbau eine andere Methodik zum Nachweis von Proliferation etabliert wurde, der MTT-Assay, wurden die Methoden verglichen und zusätzlich auch die Proliferation mittels Zellzählung bestimmt. Hier erwiesen sich die Methoden als gleichwertig bezüglich der Aussage einer gesteigerten Proliferation bezogen auf Kontrollzellen (Daten nicht gezeigt).

Jedoch sprachen sowohl die einfache Durchführbarkeit und der Verzicht auf Radioaktivität dafür, Teile der vorgesehenen Fragestellung nochmals mit dieser neuen Methode zu bearbeiten. Zusätzlich konnten die teilweise immensen Standardabweichungen in den Dreifachansätzen des ^3H -Thymidin-Einbaus durch die Zwölfbestimmungen im MTT-Assay deutlich reduziert werden.

Die absolute Inkubationszeit der BSMC wurde zwar beibehalten, jedoch wurde die Zeit reduziert, in der das Substrat, das die Proliferation letztendlich anzeigen sollte, dem jeweiligen Testansatz zugegeben wurde. Außerdem wurden die Testansätze nicht mehr in serumfreiem Medium durchgeführt, sondern es wurde 1% FCS zugesetzt. Hierdurch sollte die Vitalität der Zellen verbessert werden, als Grundlage für physiologische Reaktionen auf die Testsubstanzen. Durch diese beiden Veränderungen ist die insgesamt verringerte maximale Proliferationszunahme gegenüber den Ergebnissen aus dem ^3H -Thymidin-Einbau zu erklären.

3.3.1 Oxidierte LDL

Zur genaueren Charakterisierung des Effektes durch die an der Atherosklerose vornehmlich beteiligten schädlichen Einflüsse der oxidierten LDL wurden BSMC mit verschiedenen Konzentrationen (1µg/ml, 5µg/ml, 10µg/ml, 20µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml und 200µg/ml) oxLDL für 24 Stunden inkubiert.

Hier konnte in $n = 4$ eine deutliche, statistisch signifikante Dosis-Wirkungs-Beziehung gefunden werden, wobei die maximale Steigerung der Proliferation bezogen auf die Kontrollzellen bei ca. 120% im Bereich von 10µg/ml bis 20µg/ml oxLDL lag. In höheren Konzentrationsbereichen (50µg/ml bis 200µg/ml oxLDL) nahm die Proliferation dann wieder ab, und die toxischen Effekte kamen zum Tragen, ausgedrückt durch eine verringerte Proliferation im Vergleich zu den Kontrollzellen.

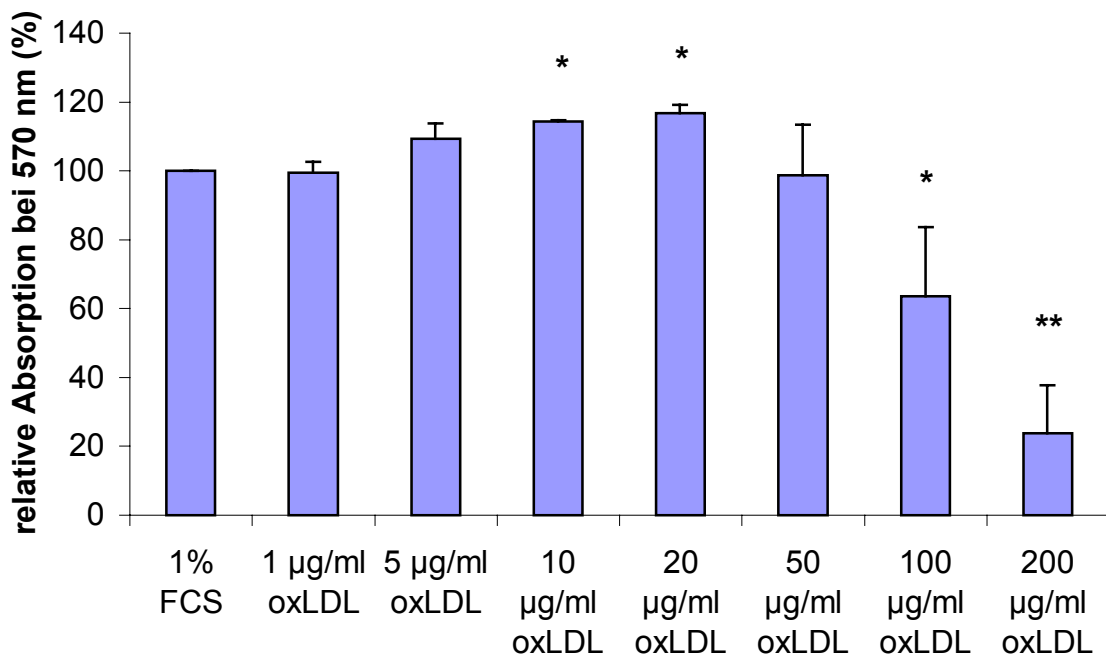


Abb.9: Relative Absorptionszunahme bei 570 nm als Ausdruck der gesteigerten Proliferation von BSMC durch Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von oxLDL.

Die Säulen stellen die Mittelwerte aus Zwölfbestimmungen von $n = 4$ unabhängigen Versuchen \pm SEM dar. Durch zweiseitigen gepaarten T-Test erwiesen sich die Ergebnisse als signifikant bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ (durch * dargestellt) und hoch signifikant bei $p \leq 0,001$ (durch ** dargestellt).

3.3.2 Angiotensin II

Ebenso sollte eine ähnliche Wirkung von Angiotensin II laut herrschender Lehrmeinung in den Zellen nachgewiesen werden können. BSMC wurden mit den veröffentlichten Konzentrationen Angiotensin II für wiederum 24 Stunden inkubiert, und die Proliferation mittels MTT-Assay gemessen.

Auch wenn nur ein Versuch durchgeführt wurde, so lässt sich hier schon vermuten, dass sich auch durch eine andere Methode in der vorliegenden Primärzelle keine Proliferationssteigerung durch Inkubation mit Angiotensin II nachweisen lässt.

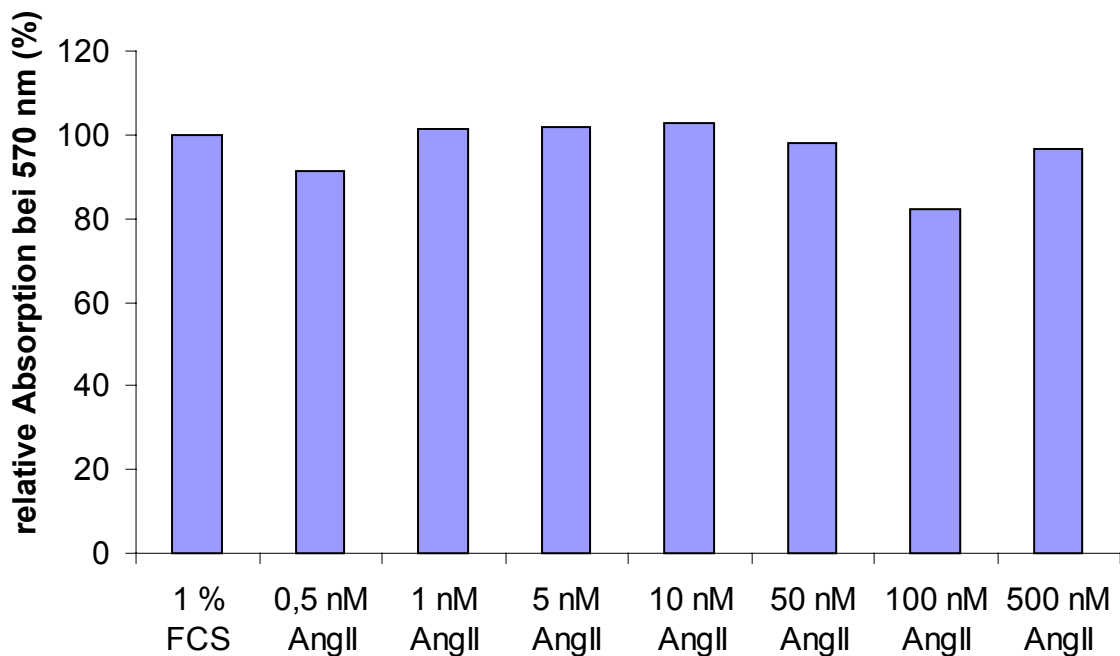


Abb.10: Relative Absorption bei 570 nm in BSMC durch Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Angiotensin II.

Die Säulen zeigen die Mittelwerte aus Zwölfbestimmungen eines Versuchsansatzes.

3.4 Proliferationsnachweis mittels MTT-Assay in NHMC

Vergleichbar den Veränderungen, die in den Versuchen mit BSMC durchgeführt wurden, blieb die Inkubationsdauer mit 48 Stunden im MTT-Assay bei NHMC gleich, jedoch wurde „MTT-solution“ laut Herstellerangabe für lediglich vier Stunden zugegeben. Auch wurde allen Versuchsansätzen mit Mesangialzellen nun 1% FCS zugesetzt.

3.4.1 Oxidierte LDL

Hier konnten nun gleichfalls statistisch signifikante Dosis-Wirkungs-Beziehungen dargestellt werden, in denen eine gesteigerte Proliferation bis auf 137%, bezogen auf die Kontrollzellen, nachgewiesen werden konnte. Verglichen mit den BSMC war die Proliferationszunahme somit nochmals erhöht, jedoch fiel in den Mesangiumzellen eine deutlichere Vulnerabilität bezüglich höherer Konzentrationen von oxidierten LDL auf. Dies zeigte sich in einer deutlichen Verringerung der Proliferation schon in einem Bereich von 50µg/ml oxLDL. In diesen Versuchsansätzen war die Zellzahl als Ausdruck der toxischen Wirkung bereits drastisch reduziert (Daten nicht gezeigt).

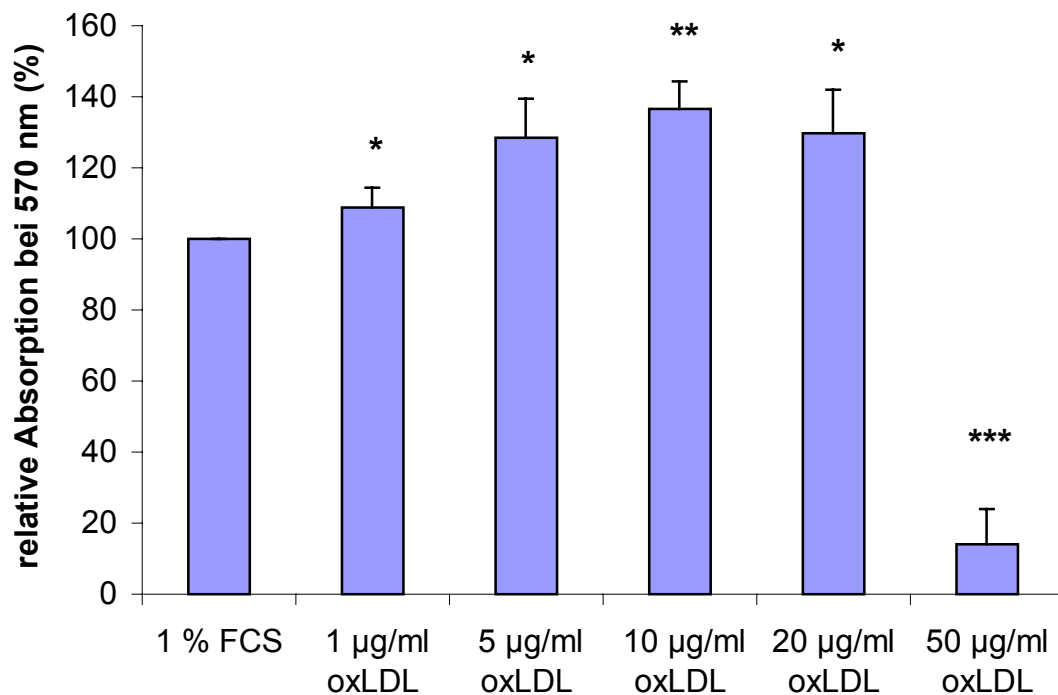


Abb.11: Relative Absorptionszunahme bei 570 nm als Ausdruck der gesteigerten Proliferation von NHMC durch Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von oxLDL.

Die Säulen stellen die Mittelwerte aus Zwölfachbestimmungen von $n = 5$ unabhängigen Versuchen \pm SEM dar. Durch zweiseitigen gepaarten T-Test erwiesen sich die Ergebnisse als signifikant bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ (durch * dargestellt) und hoch signifikant bei $p \leq 0,001$ (durch ** dargestellt) bzw. $p \leq 0,0001$ (durch *** dargestellt).

3.4.2 Angiotensin II

Abschließend für die Zahl der Proliferationsversuche soll nun ein Versuch zur Steigerung der Proliferation nach Stimulation mit Angiotensin II gezeigt werden. Auch dieser wurde mit den bereits beschriebenen Konzentrationsansätzen durchgeführt, wiederum in Medium mit 1% FCS.

Hier ließ sich nun erstmals, wenn auch nur bei $n = 1$, eine Zunahme der Wachstumsrate von ca. 140% in NHMC bezogen auf die Kontrollzellen zeigen. Wie später noch genauer erläutert werden wird, soll an dieser Stelle festgestellt werden, dass dieser Versuch mit Zellen in der 3. Passage durchgeführt wurde, also einer sehr „jungen“ Mesangialzellenpopulation.

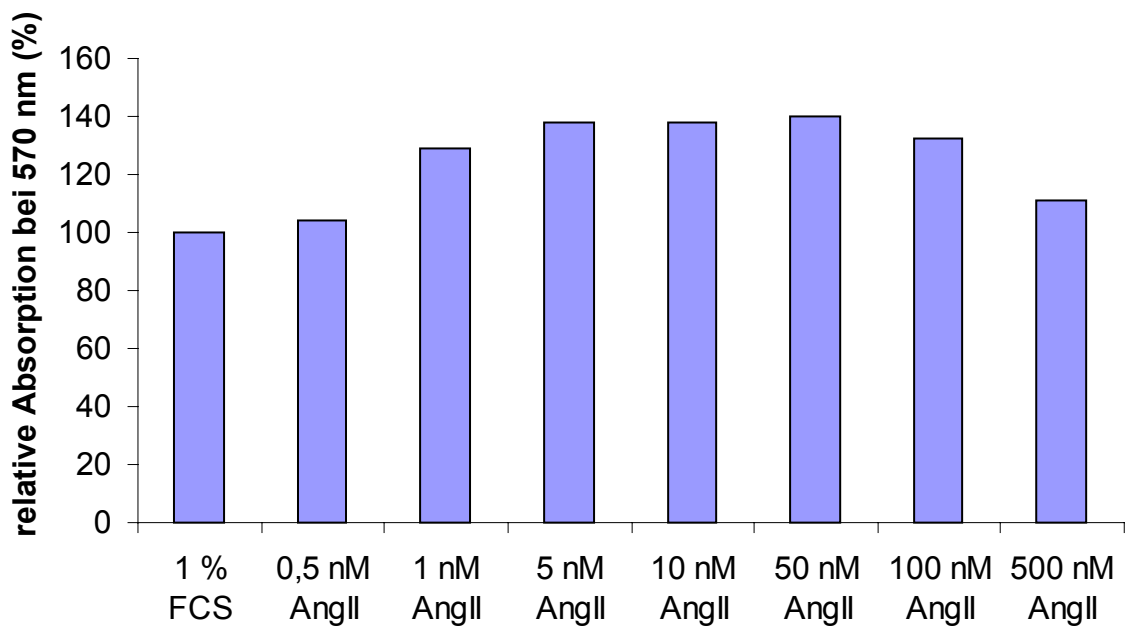


Abb.12: Relative Absorptionszunahme bei 570 nm als Ausdruck der gesteigerten Proliferation von NHMC durch Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Angiotensin II.

Die Säulen stellen die Mittelwerte aus Zwölfbestimmungen von einem Versuch mit NHMC in der 3. Passage dar.

3.5 Rezeptornachweis mittels Western Blot

Insgesamt ergaben sich in sämtlichen Proliferationsversuchen wohl Effekte durch Inkubation mit Lipoproteinen, aber keine statistisch signifikanten Ergebnisse bezüglich einer Stimulation mit Angiotensin II. Wie bereits angesprochen, sind mittlerweile viele Daten publiziert, die diese Angiotensin II bedingten Effekte zeigten, und die auch deren Zusammenhang mit den jeweiligen Angiotensin II-Rezeptoren nachweisen konnten⁷¹⁻⁷⁸. Folglich sollte nun sowohl der AT₁- als auch der AT₂-Rezeptor auf Proteinebene im Western Blot nachgewiesen werden.

3.5.1 Stimulation der Rezeptordichte in NHMC

3.5.1.1 AT₁-Rezeptor

Zum Nachweis des AT₁-Rezeptors wurden zusätzlich zu Kontrollen in serumfreiem Medium und Kulturmedium Inkubationsansätze gewählt, die die Expressionsdichte des Rezeptors ändern sollten. Dies stellten im positiven Sinne einerseits verschiedene Konzentrationen von nativen⁴⁸ und oxidierten¹³⁸ Lipoproteinen dar, andererseits die Inkubation mit 1 µM Dexamethason⁵¹. Als Kontrolle bezüglich einer Herabregulation der AT₁-Rezeptordichte wurde der Versuchsansatz mit 1 nM Angiotensin II inkubiert⁵².

In vorliegenden Versuchen konnte keine Änderung in der Expressionsdichte nachgewiesen werden. Auch die Inkubation mit Dexamethason und Angiotensin II ergab keine signifikante Änderung.

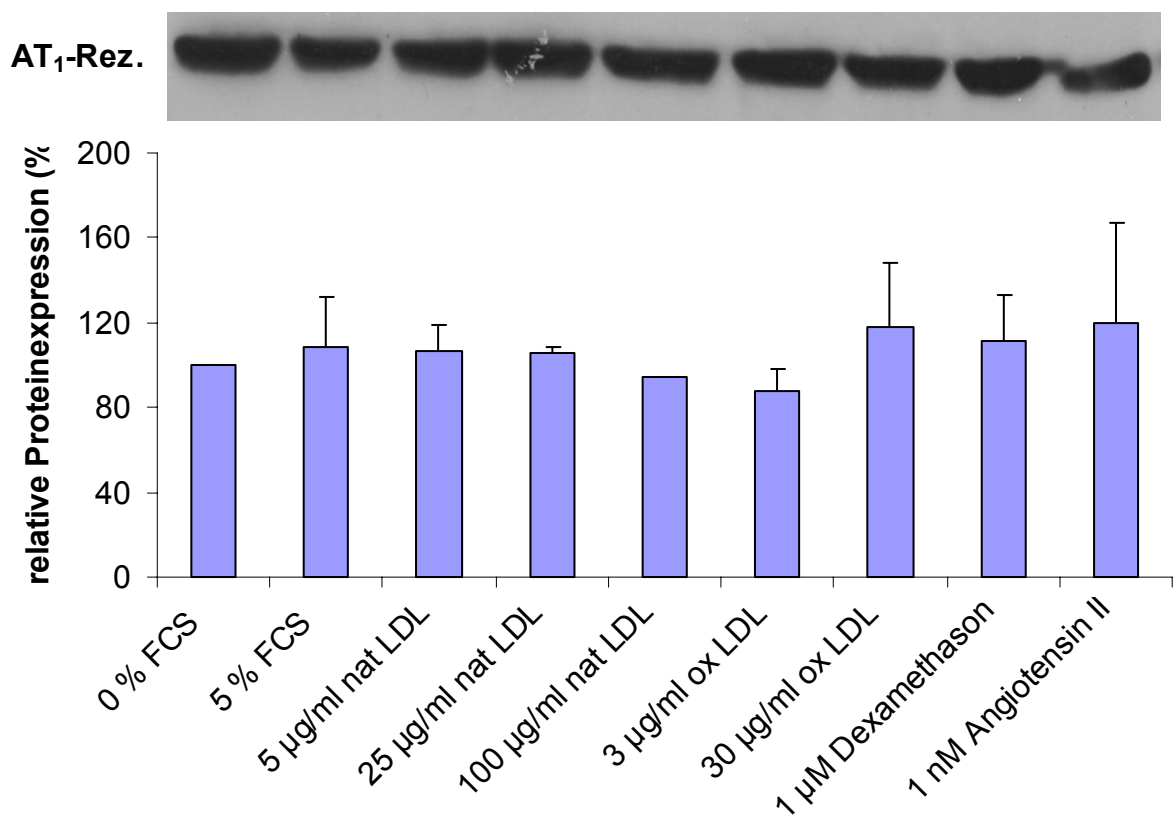


Abb.13: Western Blot zum Nachweis des AT₁-Rezeptors auf Proteinebene in NHMC nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen nativen und oxidierten LDL, 1 µM Dexamethason als Positivkontrolle, 1 nM Angiotensin II als Negativkontrolle. Aufgetragen waren 50 µg Protein in einem 10 % Polyacrylamid-Gel.

Die Säulen stellen die Mittelwerte aus Densitometriemessungen von n = 2 unabhängigen Versuchen ± SEM dar. Im zweiseitigen gepaarten T-Test konnten keine Signifikanzen errechnet werden.

3.5.1.2 AT₂-Rezeptor

Für Effekte durch Angiotensin II, die über den AT₂-Rezeptor vermittelt werden, war im vorliegenden Fall v.a. die Proliferationshemmung⁷⁴ interessant, weshalb in den gleichen Inkubationsansätzen wie für den AT₁-Rezeptor, diesmal der AT₂-Rezeptor auf Proteinebene nachgewiesen werden sollte.

Auch hier ergaben sich keine signifikanten Ergebnisse, jedoch Tendenzen, dass LDL in niedrigen Konzentrationen (nativ 5 bis 100 µg/ml, oxidiert 3 µg/ml) die Expressionsdichte steigern können. Dexamethason scheint keine Veränderung zu bewirken, Angiotensin II selbst wohl eher eine Reduktion der Rezeptordichte.

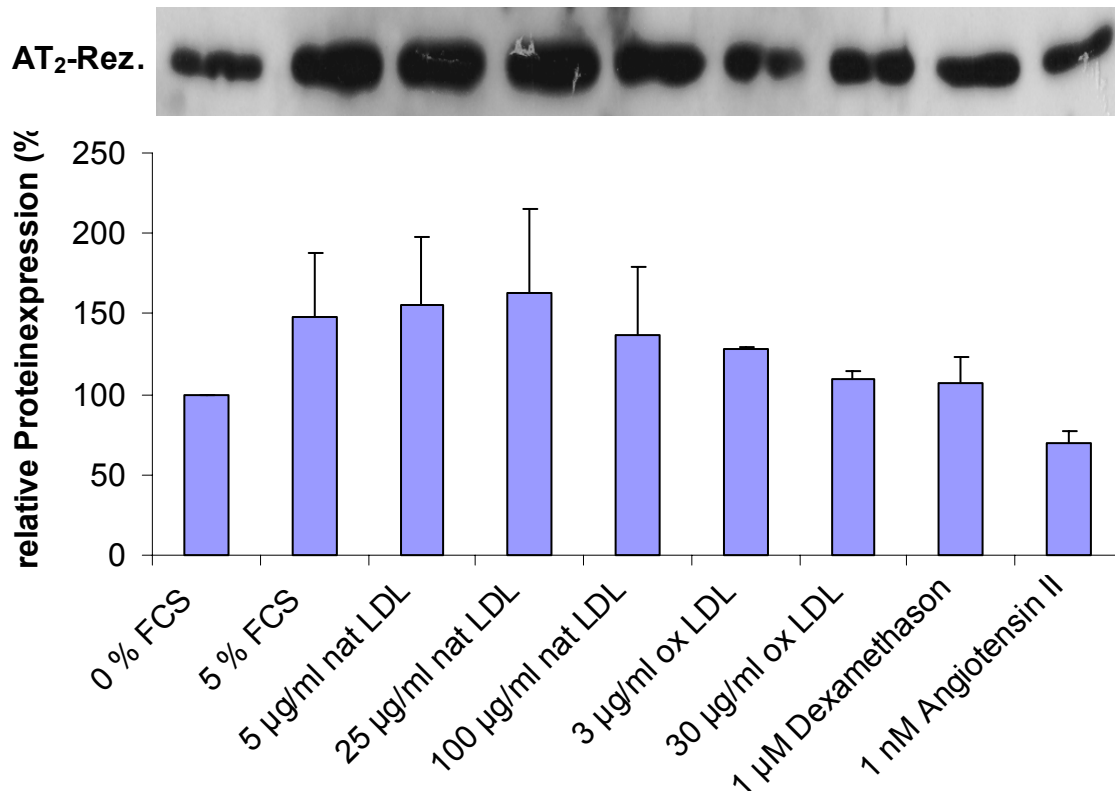


Abb.14: Western Blot zum Nachweis des AT₂-Rezeptors auf Proteinebene in NHMC nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen nativen und oxidierten LDL, 1 µM Dexamethason und 1 nM Angiotensin II. Aufgetragen waren 50 µg Protein in einem 10 % Polyacrylamid-Gel.

Die Säulen stellen die Mittelwerte aus Densitometriemessungen von $n = 2$ unabhängigen Versuchen \pm SEM dar. Im zweiseitigen gepaarten T-Test konnten keine Signifikanzen errechnet werden.

3.5.2 Rezeptordichte in höheren Zellkultur-Passagen

Für die vorherigen einzelnen Versuche wurden NHMC ebenso wie für die Proliferationsversuche in der 7. bis zur 9. Passage verwendet. Es zeigten sich insgesamt teilweise sehr starke Standardabweichungen und dadurch sehr unterschiedliche Effekte, weshalb nun die Rezeptorexpression in BSMC und NHMC in unterschiedlichen Passagen untersucht werden soll.

3.5.2.1 AT₁-Rezeptor

BSMC und NHMC wurden ohne spezifische Inkubation in Kulturmedium angezchtet und für die Proteindarstellung im Western Blot geerntet.

Auch wenn die Ergebnisse aus nur einem Versuchsansatz gewonnen wurden, so zeigt sich sowohl für die BSMC als auch die NHMC eine Verringerung der AT₁-Rezeptordichte, je älter die Zellen werden. Diese sehr unterschiedliche Expression des Rezeptors könnte somit für die teilweise sehr uneinheitlichen Proliferationseffekte mit hohen Schwankungen verantwortlich gemacht werden.

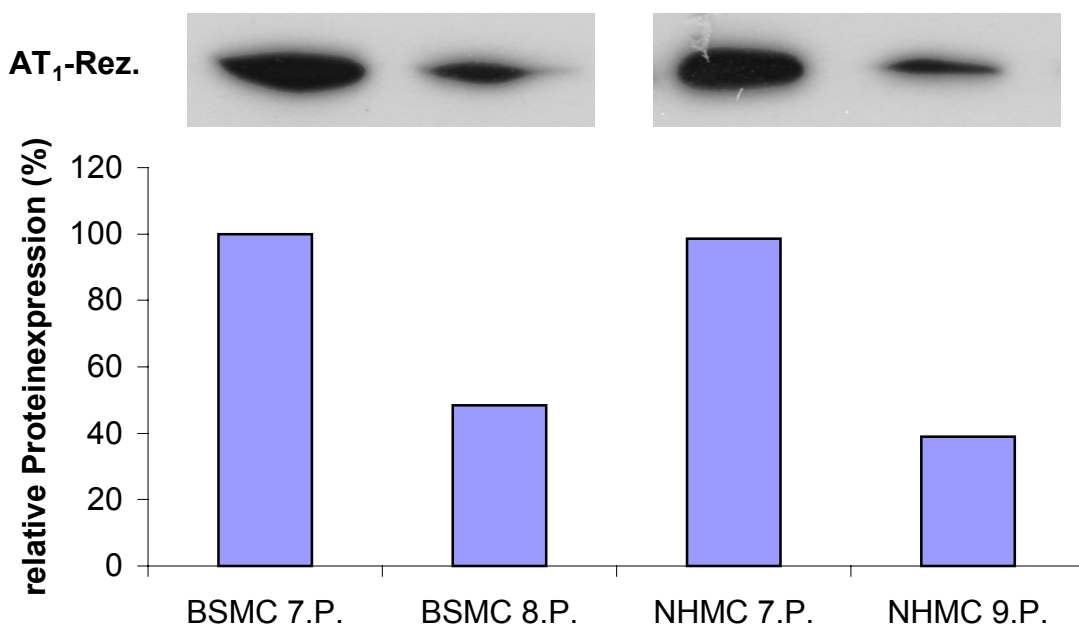


Abb.15: Western Blot zum Nachweis des AT₁-Rezeptors auf Proteinebene in BSMC und NHMC in verschiedenen Passagen. Aufgetragen waren 20 µg Protein in einem 13 % Polyacrylamid-Gel.

3.5.2.2 AT₂-Rezeptor

Ebenso sollte in den gleichen Passagen der AT₂-Rezeptor nachgewiesen werden. Hier zeigt sich ein umgekehrtes Bild im Vergleich zum AT₁-Rezeptor. Je älter die Zellen werden, umso höher wird die AT₂-Rezeptordichte. Auch dies könnte in der Zusammenschau die teilweise sehr großen Unterschiede und uneinheitlichen Ergebnisse der einzelnen Versuche erklären.

Auch wenn wiederum nur ein Versuch ausgewertet wurde, so kann zusätzlich schon hier ein Unterschied zwischen der AT₂-Rezeptor-Basisexpression in BSMC und NHMC vermutet werden.

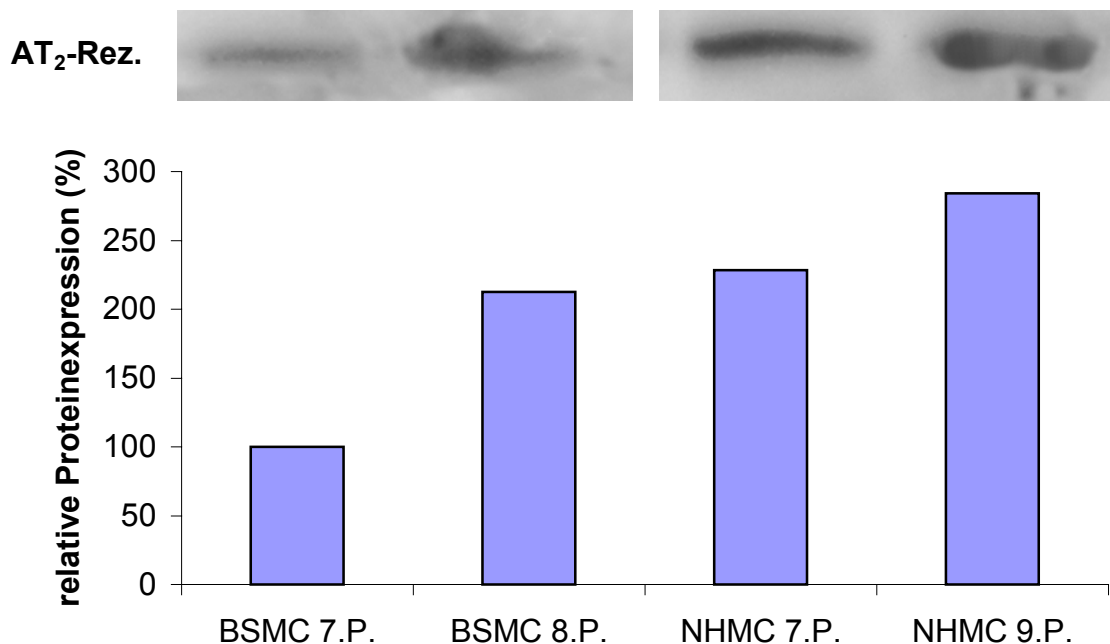


Abb.16: Western Blot zum Nachweis des AT₂-Rezeptors auf Proteinebene in BSMC und NHMC in verschiedenen Passagen. Aufgetragen waren 20 µg Protein in einem 13 % Polyacrylamid-Gel.

3.5.3 Rezeptordichte in unterschiedlichen Primärzellen bzw. Zelllinien

Um den Rezeptor in den vorherigen Versuchen auf Proteinebene im Western Blot überhaupt darstellen zu können, war insgesamt sehr viel Protein nötig (bis 50 µg), das pro Spur geladen wurde. Abschließend sollten nun die jeweiligen Rezeptoren in unterschiedlichen Primärzellen bzw. Zelllinien nachgewiesen werden, um die Basisexpression der Rezeptoren miteinander vergleichen zu können.

Als Kontrollzellen zu den BSMC und NHMC wurden humane Umbilicalvenen Endothelzellen (HUVEC) und eine Zelllinie aus mikrovaskulären Endothelzellen aus humanem Gehirn (HBMEC) verwendet, beides Zellen, deren Kultur in der Arbeitsgruppe des Laborleiters etabliert ist. Wie in den vorangegangenen Versuchen wurden die Zellen lediglich in Kulturmedium angezchtet, bevor sie zum Proteinnachweis im Western Blot geerntet wurden.

3.5.3.1 AT₁-Rezeptor

Innerhalb der Primärzellen BSMC, NHMC und HUVEC zeigten sich bezüglich des AT₁-Rezeptors keine Unterschiede in der Expressionsdichte. Einzig HBMEC scheinen eine (wenn auch bei niedriger Versuchsanzahl nicht signifikant) erhöhte Basisexpression zu besitzen.

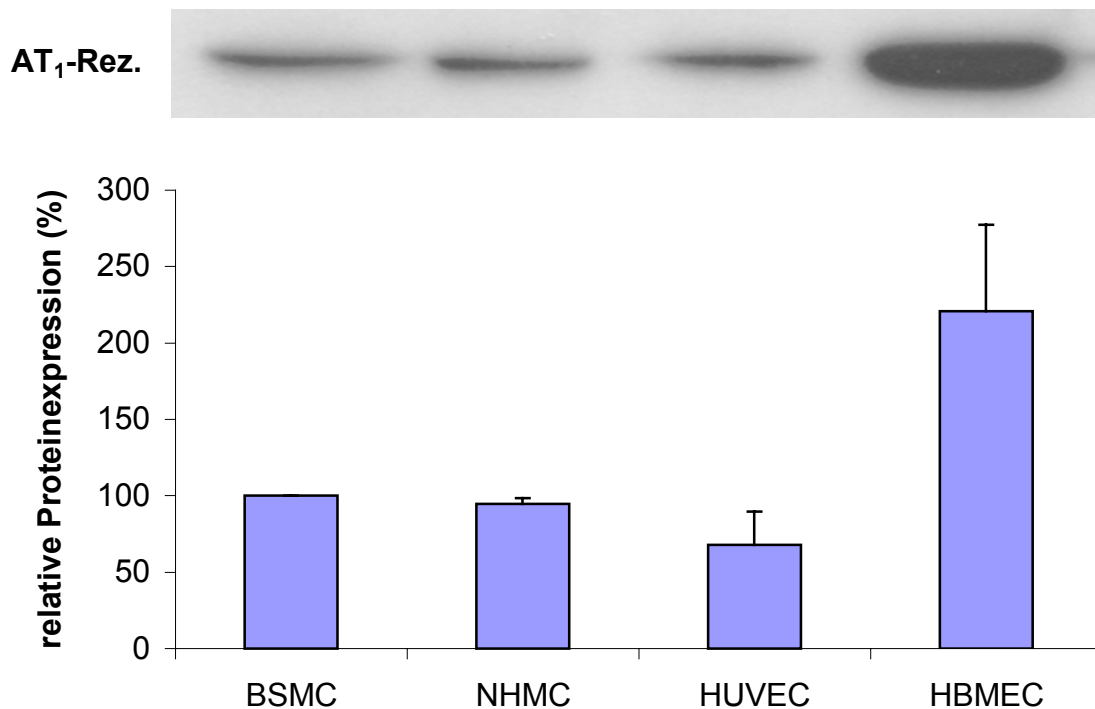


Abb.17: Western Blot zum Nachweis des AT₁-Rezeptors auf Proteinebene in unterschiedlichen Zellkulturen. Aufgetragen waren 15 µg Protein in einem 13 % Polyacrylamid-Gel.

Die Säulen stellen die Mittelwerte aus Densitometriemessungen von $n = 2$ unabhängigen Versuchen \pm SEM dar. Im einseitigen gepaarten T-Test konnten keine Signifikanzen errechnet werden.

3.5.3.2 AT₂-Rezeptor

Ebenso wurden diese Zellen bezüglich des AT₂-Rezeptors geprüft. Hier zeigten sich bei n = 2 zwar keine signifikanten Unterschiede, jedoch ließ sich eine erhöhte Basisexpression des Rezeptors für die NHMC vermuten, während BSMC, HUVEC und HBMEC eine eher niedrige Rezeptordichte aufwiesen.

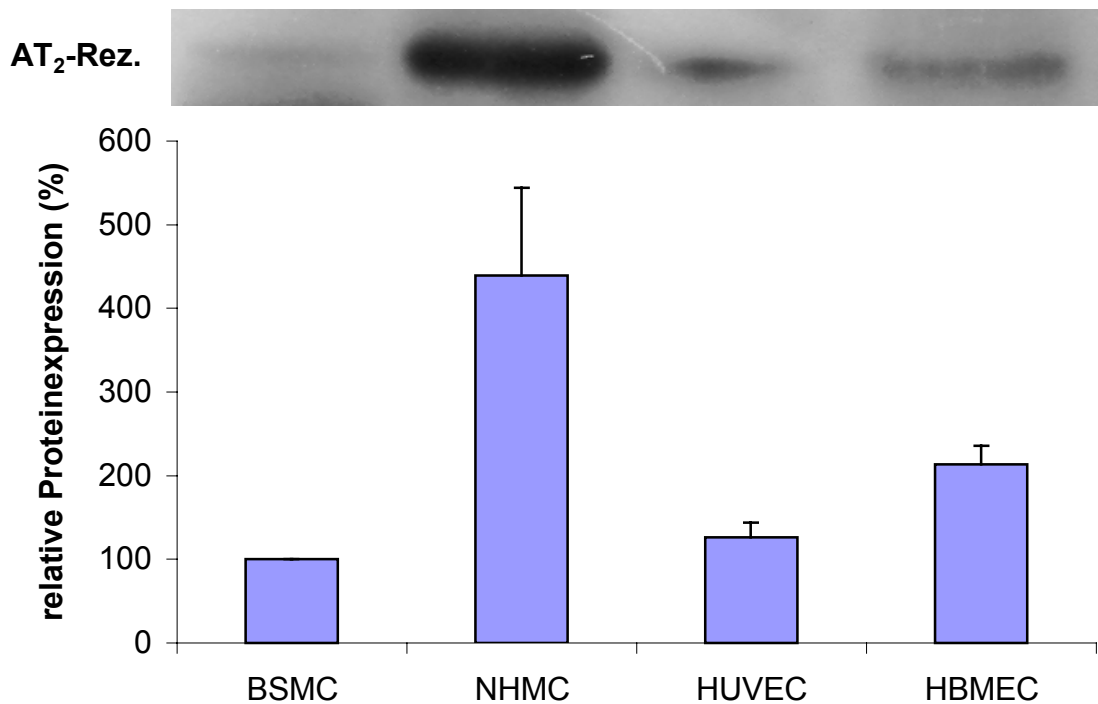


Abb.18: Western Blot zum Nachweis des AT₂-Rezeptors auf Proteinebene in unterschiedlichen Zellkulturen. Aufgetragen waren 15 µg Protein in einem 13 % Polyacrylamid-Gel.

Die Säulen stellen die Mittelwerte aus Densitometriemessungen von n = 2 unabhängigen Versuchen ± SEM dar. Im einseitigen gepaarten T-Test konnten keine Signifikanzen errechnet werden.

3.5.3.3 LOX-1-Rezeptor

Sowohl BSMC als auch NHMC zeigten eine gesteigerte Proliferation auf native, aber v.a. auch auf oxidierte LDL. Einen Rezeptor, der oxLDL bindet, und über den diese Effekte vermittelt sein könnten, stellt der LOX-1-Rezeptor dar¹³¹. Mittels eines durch Immunisierung von Kaninchen selbst hergestellten LOX-1-Antikörpers konnte dieser Rezeptor in den untersuchten Zellen im Western Blot nachgewiesen werden. In einem einzelnen Versuch zeigten sich keine Unterschiede in der Expression.

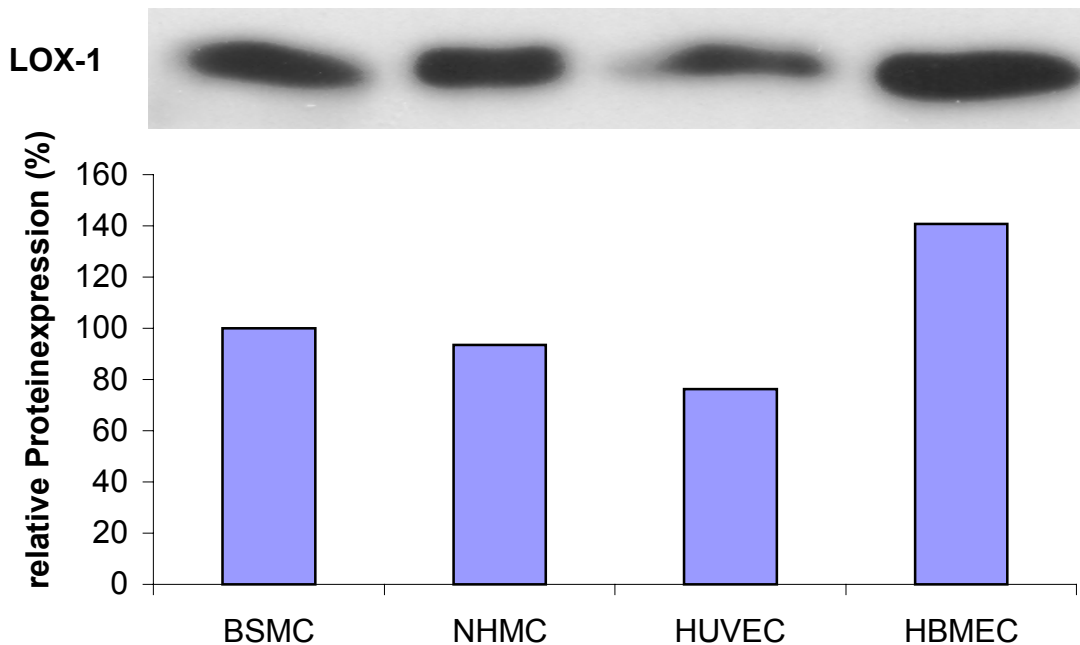


Abb.19: Western Blot zum Nachweis des LOX-1-Rezeptors auf Proteinebene in unterschiedlichen Zellkulturen. Aufgetragen waren 15 μg Protein in einem 13 % Polyacrylamid-Gel.

3.6 Interaktion von Dil-oxLDL in der Histochemie in BSMC

Zur genaueren Charakterisierung der Interaktion von oxLDL mit den jeweiligen Zellen wurden oxLDL mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Dil) markiert, die Zellen mit 5 µg/ml bzw. 20 µg/ml Dil-oxLDL inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten (5, 15 und 60 Minuten, sowie nach 24 Stunden) für die Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop fixiert.

In den Übersichtsbildern kann eine zeitabhängige Steigerung der Fluoreszenzmarkierung der Zellen, als Ausdruck der vermehrten Aufnahme von Dil-oxLDL in die Zellen beobachtet werden, die bis zu 24 Stunden nachweisbar ist (*Abb. 20*). In der starken Vergrößerung sieht man, dass diese Internalisierung über Vesikel geschieht. Sind nach fünf Minuten die Zellen eher homogen angefärbt mit nur wenigen kleinen Vesikeln, so sind diese nach einer Stunde bereits deutlich zu sehen. Nach 24 Stunden ist ein Großteil des Zytoplasmas mit Vesikeln angefüllt, die Zelle scheint fast zu bersten (*Abb. 21*).

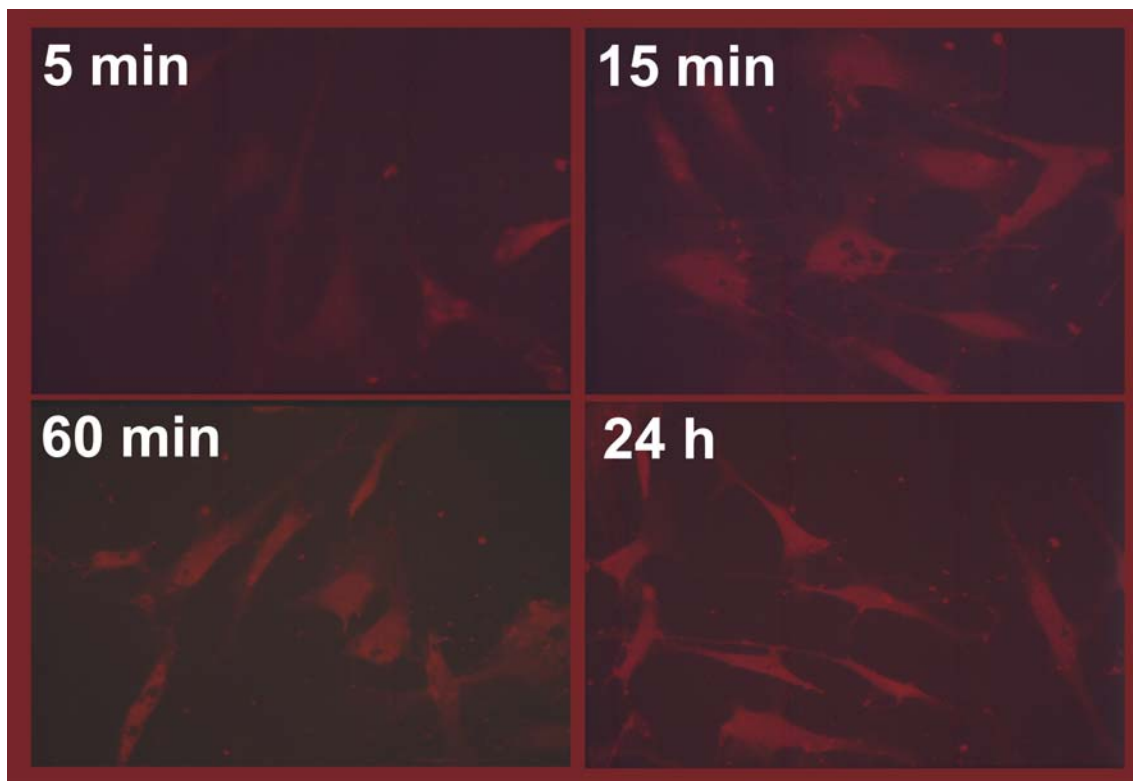


Abb.20: Histochemische Färbung von BSMC zum Nachweis der Interaktion und Kinetik von 5 µg/ml Dil-oxLDL nach 5, 15 und 60 Minuten bzw. nach 24 Stunden. Vergrößerung 40-fach, Belichtungszeit 30 sec.

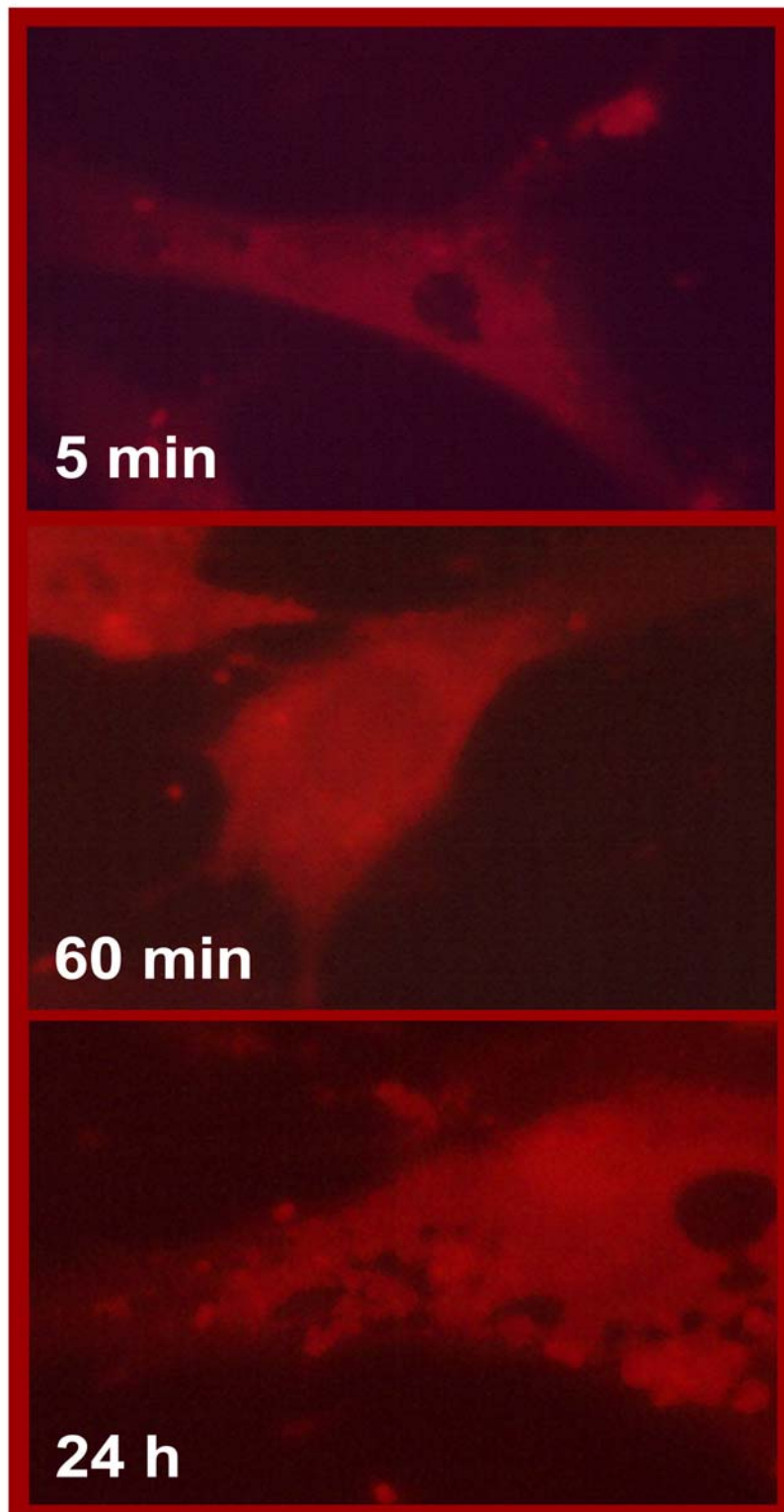


Abb.21: Histochemische Färbung von BSMC zum Nachweis der Interaktion und Kinetik von 20 µg/ml Dil-oxLDL nach 5 und 60 Minuten bzw. nach 24 Stunden. Vergrößerung 63-fach, Belichtungszeit 30 sec.

3.7 Dil-oxLDL-Internalisierung in NHMC

Zur Quantifizierung dieser Interaktion und Aufnahme der Dil-oxLDL in die Zellen wurden die internalisierten Dil-oxLDL separiert und deren Fluoreszenz am Spektrometer gemessen. Es ließ sich eine konzentrationsabhängige Aufnahmesteigerung der markierten oxLDL nachweisen, wobei bereits nach 14 Stunden ein Großteil internalisiert zu sein scheint, somit nach dieser Inkubationszeit die Aufnahme sättigbar erscheint.

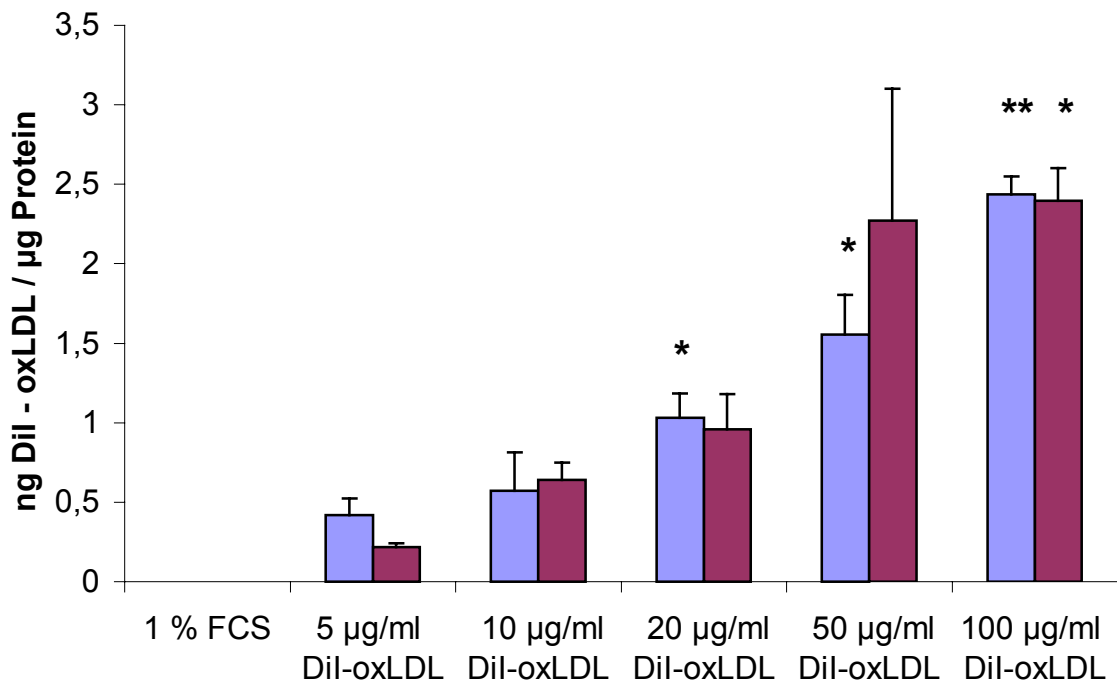


Abb.22: Dil-oxLDL Internalisierung gemessen mittels Fluoreszenzspektrometer an NHMC nach 14 Stunden (graue Säulen) bzw. 24 Stunden (schwarze Säulen) Inkubation mit 5, 10, 20, 50 und 100 µg/ml Dil-oxLDL.

Die Säulen stellen die Mittelwerte aus Fluoreszenzmessungen von $n = 2$ unabhängigen Versuchen \pm SEM dar. Im einseitigen gepaarten T-Test bezogen auf den jeweiligen Wert der 5 µg/ml Dil-oxLDL Inkubation in den verschiedenen Inkubationsreihen, erwiesen sich die Ergebnisse als signifikant bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ (durch * dargestellt) und hoch signifikant bei $p \leq 0,001$ (durch ** dargestellt).

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen (BSMC) und Mesangiumzellen (NHMC) auf die Inkubation mit Angiotensin II und atherogenen Lipoproteinen untersucht werden, beides Agenzien, die in der Pathogenese der Arteriosklerose eine Schlüsselrolle einnehmen. Diese Substanzen sind sowohl dazu in der Lage, den Gefäßtonus zu verändern, als auch auf zellulärer Ebene Reaktionen zu bewirken, die zum Fortschreiten der gefäßschädigenden Vorgänge führt. Diese stellen unter anderem Eingriffe in die Regulation des Zellzyklus dar, weshalb vor diesem Hintergrund die proliferationsbeeinflussenden Wirkungen untersucht werden sollten.

Die Grundlage für eine Interaktion von Angiotensin II und atherogenen Lipoproteinen, die durch den aktuellen Stand der Forschung wohl angenommen werden kann (s.o.), bildeten Dosis-Wirkungs-Beziehungen für die jeweiligen Einzelsubstanzen, um eine mögliche Potenzierung des Effektes quantifizieren zu können.

Zur Charakterisierung der spezifischen Effekte durch oxidierte LDL sollte der LOX-1-Rezeptor in den untersuchten Zellsystemen nachgewiesen werden, als Hinweis auf seine mögliche Beteiligung in der Signalkaskade. So stellt der LOX-1-Rezeptor einen spezifischen Rezeptor für oxidierte Lipoproteine dar, der bereits an den untersuchten Zellarten nachgewiesen werden konnte^{128,129}. Oxidierte LDL werden über den LOX-1-Rezeptor¹²⁹ – ebenso wie native Lipoproteine über den ApoE/ApoB-100 Rezeptor⁸⁸ – über Endozytose in die jeweilige Zielzelle aufgenommen, weshalb sowohl die Wechselwirkungen von oxLDL nach Fluoreszenzmarkierung qualitativ, als auch die Internalisierung quantitativ bestimmt werden sollten.

Ebenso sollten die Angiotensin II bedingten Effekte durch den Nachweis der Rezeptoren AT₁ und AT₂ auf Proteinebene spezifiziert werden, bzw. durch die Hemmung des AT₁-Rezeptors durch Losartan eingegrenzt werden, sind ja für beide Signalwege antagonistische Auswirkungen insbesondere auf den Zellzyklus beschrieben.

4.1 Effekte atherogener Lipoproteine

4.1.1 LDL induzieren Proliferation in BSMC und NHMC

Sowohl in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen als auch in Mesangiumzellen induzierte die Inkubation mit Low Density Lipoproteinen eine Steigerung der Proliferation bezogen auf die Kontrollzellen.

In BSMC resultierte im Proliferationsassay mit Tritium eine zunehmende Proliferation mit steigender Inkubationskonzentration mit nativen LDL. Ein Maximum wurde bei 10 µg/ml erreicht, hier lag die Proliferation beim 4,5-fachen bezogen auf das Kontrollniveau. Eine weitere Steigerung der Konzentration auf 50 µg/ml führte wieder zu einem Abfall der Proliferation. Oxidierte LDL bewirkten ebenfalls eine konzentrationsabhängige Zunahme der Proliferation, hier lag das Maximum beim 3,5-fachen bei einer Konzentration von 20 µg/ml oxLDL.

Vergleichbare Ergebnisse lieferten die Tritium-Assays bei den Mesangialzellen NHMC. Auch hier führte sowohl die Inkubation mit nativen als auch mit oxidierten LDL zu einer gesteigerten Proliferationsrate, wenn auch in weitaus geringerem Maße: 10µg/ml native LDL führten hier lediglich zu einer Steigerung auf das 1,5-fache, 3 µg/ml oxidierte LDL zu einer nicht signifikanten Steigerung auf das knapp 2-fache.

Wie bereits angesprochen ist die Quantifizierbarkeit dieser Daten aufgrund der teilweise sehr hohen Standardabweichungen in den jeweiligen Versuchsansätzen sehr kritisch zu sehen, weshalb sich nach Änderung der Methodik und der Versuchsbedingungen die Ergebnisse deutlicher nachvollziehen lassen.

Im MTT-Assay ließ sich nun in vaskulären Myozyten eine signifikante Dosis-Wirkungs-Beziehung darstellen, in der nach Inkubation mit 20 µg/ml oxidierten LDL ein Maximum von 120%, bezogen auf die Kontrollzellen, erreicht wurde. Eine Steigerung der Inkubationskonzentration führte wiederum zu einer Reduktion dieses Effektes, der dann in Konzentrationsbereichen ab 100 µg/ml zu einer Schädigung der Zellen und damit zu einer reduzierten Proliferation bezogen auf die Kontrollzellen führte.

In NHMC zeigte sich diese Dosis-Wirkungs-Kurve nach links verschoben, so führten bereits 10 mg/ml oxLDL zu einer Zunahme der Proliferation auf fast

140%, die Schädigung der Zellen ließ sich bei einer Konzentration von 50 µg/ml deutlich erkennen.

Diese Steigerung der Proliferation in den jeweiligen Zellen war also in den beiden Methoden durchaus vergleichbar, jedoch konnte man erhebliche Unterschiede feststellen, was das Ausmaß der Effekte anging. Dies lässt sich durch zwei entscheidende Änderungen im Versuchsansatz erklären:

- 1) Im Tritium-Assay wurden die Zellen mit radioaktivmarkiertem Thymidin über insgesamt sieben Stunden bei den BSMC und 12 Stunden bei den NHMC inkubiert. Im MTT-Assay wurde das proliferationsdetektierende Agens dagegen lediglich für vier Stunden zugegeben.
- 2) Beim Wechsel der Methoden wurde zudem das Versuchsmedium geändert: Wurden beim Tritiumeinbau die Zellen in serumfreiem Medium inkubiert, geschah dies beim MTT-Assay in Medium mit 1% FCS. Hierdurch versprach man sich über verbesserte Lebensbedingungen eine bessere Vitalität der Zellen, auch wenn die proliferationssteigernden Effekte bezogen auf das Kontrollniveau dadurch nicht so deutlich ausfielen wie im Tritium-Assay.

Somit war der MTT-Assay unter den hier verwendeten Versuchsbedingungen dem Tritiumeinbau hinsichtlich der Sensitivität überlegen; eine Beobachtung, auf die später noch genauer eingegangen werden soll.

4.1.2 OxLDL wird über Endozytose internalisiert

Durch Fluoreszenzmarkierung der oxidierten LDL mit Dil¹⁴⁸ konnte die Interaktion zwischen oxLDL und den inkubierten Zellkulturen sowohl sichtbar als auch messbar gemacht werden.

Dil-oxLDL wurden von den Zellen in einem zeitabhängigen Prozess mittels Endozytose in Vesikeln aufgenommen^{88,129}. Dies begann bereits nach fünf Minuten, und war nach 60 Minuten deutlich zu sehen. Nach 14 Stunden schien diese Internalisierung eine Sättigung zu erreichen, d.h. die Dil-oxLDL-Menge, die auch aufgenommen werden sollte, ist bereits nach dieser Zeit internalisiert, es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen 14 und 24 Stunden Inkubation.

Diese Internalisierung war zudem konzentrationsabhängig, je höher die Inkubationskonzentration war, umso mehr Dil-oxLDL wurde in der gleichen Zeit in die Zelle aufgenommen, bis nahezu das gesamte Zytoplasma mit Dil-oxLDL-Vesikeln angefüllt war, man könnte fast sagen, „bis die Zelle zerbarst“.

Die Aufnahme von oxLDL geschieht also über Endozytose in einem konzentrations- und zeitabhängigen Prozess, der nach 14 Stunden eine Sättigung erreicht hat. Hohe Konzentrationen an oxLDL (bis 100 µg/ml) hemmen die Internalisierung nicht, im Gegenteil führen sie zu einem Maximum der Aufnahme. In diesen Konzentrationen von 100 µg/ml entfalten oxLDL bereits apoptotische Effekte, bzw. sind bereits zytotoxisch und führen zu Nekrose^{111,120,121}.

Die Auswirkung von oxLDL in den verschiedenen Konzentrationen, folglich auch die proliferationssteigernde durch niedrige OxLDL-Konzentrationen¹¹⁶⁻¹¹⁹, könnte also über ihre Internalisierung in die Zelle vermittelt werden.

4.1.3 **Der LOX-1-Rezeptor wird auf BSMC und NHMC exprimiert**

Ein bekannter Rezeptor, der spezifisch oxidativ veränderte LDL bindet, ist der Lectin-like oxLDL-Rezeptor-1 (LOX-1)¹³⁰. Nach Herstellung eines polyklonalen Antikörpers, der gegen den N-Terminus dieses Rezeptors gerichtet ist¹²⁹, ließ sich das Rezeptorprotein in den beiden Primärzellkulturen und anderen Referenzzellen mittels Western Blot-Analyse nachweisen.

Hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Expressionsdichte in BSMC und NHMC. Die Endothelzelllinie HBMEC scheint eine höhere, die Primärzelle HUVEC eine eher niedrige Basisexpression des Rezeptors zu besitzen.

Dieser Rezeptor, der erstmals in Endothelzellen beschrieben wurde¹³⁰, ist also auch auf anderen Zellen, die an der Athero- und Glomerulosklerose beteiligt sind, zu finden¹²⁹. Inwieweit er für die beschriebenen Effekte, d.h. die Internalisierung von oxLDL und möglicherweise hierüber die gesteigerte Proliferation oder apoptotische Prozesse, verantwortlich gemacht werden kann, muss in Zukunft weiter geklärt werden.

4.1.4 Die Rolle von LDL im Zellzyklus

Low Density Lipoproteine und ihre oxidativ veränderten Formen, die oxLDL, entfalten ihre Effekte in unterschiedlichen Gebieten und Schritten in athero- und glomerulosklerotischen Prozessen.

OxLDL verändern die Kontraktibilität von Gefäßen, auch wenn sie alleine keine Vasokonstriktion hervorrufen können. Die Beteiligung der GTPase RhoA in der Signalkaskade wurde in diesen Versuchen nachgewiesen¹⁰³. Diese RhoA-Aktivierung bewirkt eine Phosphorylierung der Myosin-Leicht-Kette und ist somit als ein entscheidender Schritt in der Vermittlung des oxLDL-Effektes für eine Kontraktion anzusehen¹⁴⁹.

An anderer Stelle konnte unsere Arbeitsgruppe bereits zeigen, dass oxidativ veränderte LDL in HUVEC über O_2^- -Produktion durch die NADPH-Oxidase zu Proliferation¹¹⁶ und in hohen Konzentrationen zu Apoptose¹²⁰ führen. Die Arbeitsgruppe um Seasholtz konnte 2001 die über eine RhoA-Aktivierung vermittelte Proliferation über die Herabregulation des Zyklinkinaseinhibitors p27^{kip1} erklären¹²⁴.

Nimmt man diese Ergebnisse zusammen, kann man postulieren, dass oxLDL über eine RhoA-Aktivierung eine Suppression von p27^{kip1} bewirken, und dass daran Superoxidanionen, die über die NADPH-Oxidase gebildet wurden, beteiligt sind. Hieraus würde ein Fortschreiten im Zellzyklus resultieren, das in niedriger OxLDL-Konzentration zur Proliferation führt, in höherer Dosis zur Apoptose.

Ein Teil dieser Hypothese konnte bislang bestätigt werden, so bewirkten oxLDL tatsächlich in niedrigen Konzentrationen über einen RhoA vermittelten Weg eine p27^{kip1}-Suppression und dadurch eine Proliferation. Bei Inkubation mit höheren OxLDL-Konzentrationen ließ sich diese p27^{kip1}-Veränderung nicht beobachten, die Zellen verharrten in der G₁-Phase des Zellzyklus und hypertrophierten¹²².

Dass diese oxLDL induzierte Proliferation möglicherweise über den LOX-1-Rezeptor vermittelt ist, lässt sich mit Grund vermuten. OxLDL werden über ihren spezifischen LOX-1-Rezeptor über Endozytose aufgenommen¹²⁹. Salvayre beschreibt die Wege, über die diese internalisierten oxLDL via gesteigerten oxi-

dativen Stress zur Apoptose führen ¹⁵⁰. Zusätzlich kann eine sehr schnelle – wohl internalisierungsunabhängige – Freisetzung von ROS bereits durch die Bindung von oxLDL an den LOX-1-Rezeptor beobachtet werden ¹⁵¹. Dass diese ROS nicht notwendigerweise auch Superoxidanionen darstellen müssen und dies trotzdem zur Apoptose und zum Zelltod führen kann, zeigte Asmis kürzlich in Makrophagen ¹⁵².

Hieraus lässt sich also durchaus auch erklären, weshalb in den vorliegenden Versuchen eine Steigerung der Proliferation durch native LDL gefunden werden konnte, obwohl Ding und van Goor bereits 1997 nachwies, dass die Inkubation von Endothelzellen und Mesangiumzellen mit nativen LDL nicht zu einer vermehrten O_2^- -Bildung führt ¹¹⁵. Somit scheint auch in der Signalkaskade von nativen LDL ein von Superoxidanionen unabhängiger Weg zum Fortschreiten im Zellzyklus und damit zur Proliferation führen zu können.

Um die Rolle des LOX-1-Rezeptors weiter aufzuklären, bieten sich Versuche an, in denen die untersuchten Zellen mittels Transfektion spezifischer DNA-Sequenzen den LOX-1-Rezeptor überexprimieren bzw. dessen Expression durch siRNA-Transfektion kontrolliert verhindert wird.

Auch die beteiligten Signalwege über RhoA bzw. O_2^- -Bildung über die NADPH-Oxidase könnten hierbei genauer charakterisiert werden. Eine Möglichkeit bieten Hemmungen der Signale einerseits durch den Rho-Kinase-Inhibitor y27632 ¹⁵³ andererseits durch Superoxiddismutase und Katalase, die die gebildeten reaktiven Sauerstoffradikale abfangen und metabolisieren können. Auch erscheint die Transfektion mit Konstrukten sinnvoll, die bereits eine aktivierte Form bzw. eine inaktivierte Form, sogenannte „dominant positive bzw. negative“ Form, von RhoA kodieren ¹⁵⁴.

4.2 Effekte von Angiotensin II

4.2.1 Angiotensin II und Proliferation

Angiotensin II ist nicht nur einer der stärksten endogenen Vasokonstriktoren, sondern ist auch an vielen Schritten der Entstehung von Athero- und Glomerulosklerose beteiligt. Regulatorische Eingriffe in den Zellzyklus wurden beschrieben⁷⁶⁻⁷⁸, weshalb als Grundlage für die kombinierte Inkubation mit atherogenen Lipoproteinen Dosis-Wirkungs-Kurven hinsichtlich einer gesteigerten Proliferation auf Angiotensin II erstellt werden sollten. Dies konnte für die untersuchten Zellen bereits gezeigt werden⁷⁸.

Sowohl in vaskulären Myozyten als auch in Mesangiumzellen konnte mittels des Thymidineinbaus keine signifikante Proliferationssteigerung nachgewiesen werden. Tendenzen, dass eine niedrige Angiotensin II-Konzentration (1 nM) zu einer Verringerung der Proliferation führt, wurden beobachtet.

Betrachtet man diese Versuchsreihen in den einzelnen Primärzellkulturen kritisch, so fallen trotz angemessener Versuchsanzahl sehr hohe Standardabweichungen auf, die das Erreichen eines Signifikanzniveaus verhinderten. Dennoch war keine massive Proliferationssteigerung unter den herrschenden Versuchsbedingungen zu erwarten, wenn also relativ schwache Effekte auftreten sollten, würden diese durch die Ungenauigkeit des Tritiumeinbaus eventuell übersehen werden.

Nach dem bereits beschriebenen Wechsel der Methodik, wurden die Versuche wiederholt. Jedoch auch mittels MTT-Assay konnte für BSMC keine Proliferationssteigerung durch Angiotensin II in verschiedensten Konzentrationen belegt werden, die Tendenz zu einer verringerten Proliferation durch eine niedrige Inkubationsdosis (0,5 nM) zeigte sich auch hier.

In den untersuchten Mesangiumzellen kristallisierten sich andere, weitreichendere Effekte heraus. Erstmals konnte eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt werden, in der 50 nM Angiotensin II eine Zunahme der Proliferation auf ca. 140% – bezogen auf das Kontrollniveau – bewirkte. Niedrige (0,5 nM) und auch höhere Konzentrationen (500 nM) schienen hinsichtlich der in diesem Test detektierten

Proliferation keine Auswirkung zu haben, jedoch kann eine Schädigung der Zellen, eventuell über apoptotische Vorgänge durch hohe Konzentrationen von Angiotensin II, vermutet werden ^{73,74}. Bemerkenswert war, dass diese Daten mit einer sehr jungen Zellpopulation von NHMC (3. Passage) gewonnen wurden, was Anlass zu weiteren Untersuchungen war.

Zudem erbrachte in allen durchgeführten Versuchen die Koinkubation mit dem spezifischen AT₁-Rezeptor-Antagonisten Losartan keine Änderung der Proliferation. AT₁- und AT₂-Rezeptor vermittelte Effekte bewirken hinsichtlich der Proliferation entgegengesetzte Effekte, erstere wurden mit einer Steigerung ⁷², zweite mit einer Reduktion der Proliferation ⁷⁴ beschrieben. Die Hemmung des AT₁-Rezeptors sollte diesbezüglich eine reduzierte Proliferation auf Angiotensin II-Inkubation ergeben.

Losartan gehört wie alle „Sartane“ in die Gruppe der Imidazolderivate und zeichnet sich durch eine kompetitive Hemmung des AT₁-Rezeptors aus ¹⁵⁵. Das bedeutet, dass der eigentliche Rezeptorbindungspartner und der Antagonist in Konkurrenz zum Rezeptor stehen. Die Höhe der Affinität zum Rezeptor bestimmt zum einen seine „Stärke“ gegenüber dem Gegenspieler, zum anderen auch seine Wirkungsdauer. Losartan ist ein Antagonist, dessen Bindung an den Rezeptor reversibel und überwindbar ist. Zusätzlich macht eine über eine Agonisten-Bindung vermittelte Signalkaskade den AT₁-Rezeptor für eine weitere Bindung unempfindlicher ¹⁵⁶. Diese Beobachtungen als Grundlage führten dazu, dass die Zellen bereits vor Zugabe des Angiotensin II mit Losartan inkubiert wurden, und im Lauf der Angiotensin II-Inkubation zweimalig Losartan neu zugegeben wurde.

Die Ergebnisse, dass in „älteren“ Zellen Angiotensin II keine Proliferation bewirkte, dieser Effekt jedoch in „jüngeren“ Zellpopulationen – zumindest in Mesangiumzellen – nachweisbar erschien, und auch der fehlende Effekt einer AT₁-Rezeptorblockade führten dazu, die AT₁- und auch die AT₂-Rezeptorexpression in den einzelnen Zellen auf Proteinebene im Western Blot zu überprüfen.

4.2.2 Angiotensin II-Rezeptoren

In den durchgeführten Western Blot-Analysen konnten beide Rezeptoren zu jeder Zeit nachgewiesen werden, jedoch ergaben sich einige Auffälligkeiten, die hier diskutiert werden sollen.

Inkubation mit verschiedenen Agenzien sollte laut dem bisherigen Stand der Forschung die Expression des AT₁-Rezeptors, aber auch des AT₂-Rezeptors verändern. Zur Steigerung der Rezeptordichte wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen nativen und oxidierten LDL und Dexamethason inkubiert^{48,51,138}. Angiotensin II selbst sollte über einen negativen Feedback-Mechanismus die Rezeptordichte verringern⁵². In den vorliegenden Versuchsbedingungen ließ sich der AT₁-Rezeptor auf Proteinebene zwar nachweisen, jedoch waren einerseits sehr große Proteinmengen und eine lange Belichtungszeit nötig (bis 50 µg), andererseits zeigten sich keine signifikanten Expressionsveränderungen auf die verschiedenen Inkubationen.

Im Gegensatz dazu waren beim AT₂-Rezeptornachweis bei gleicher Proteinmenge deutlich kürzere Belichtungszeiten nötig, bzw. konnte weniger Protein pro Spur aufgetragen werden, um das Rezeptorprotein nachzuweisen. Signifikante Veränderungen ergaben sich zwar auch hier nicht, jedoch Tendenzen, dass sich die AT₂-Rezeptordichte durch die Inkubation mit nativen LDL steigern und durch Angiotensin II verringern ließ.

Allein hieraus kann schon gefolgert werden, dass die basale Expression des AT₂-Rezeptors höher war als die des AT₁-Rezeptors und sich durch verschiedene Inkubationen regulieren ließ.

Aufgrund der Proliferationsunterschiede bei gleicher Angiotensin II-Inkubation in den verschiedenen Zellkulturpassagen wurden nun diese Zellen auf ihre Rezeptorexpression hin überprüft. Es ergab sich das bemerkenswerte Bild, dass sich sowohl in BSMC als auch in NHMC der AT₁-Rezeptor in „jungen“ Passagen deutlich nachweisen ließ, sich seine Expressionsdichte jedoch in „älteren“ Passagen deutlich reduzierte. Für den AT₂-Rezeptor zeigte sich ein umgekehrtes Bild. Dessen Expression schien sich im Lauf der Passagen zu erhöhen.

Zum Vergleich der Basisexpressionen der Rezeptoren wurden BSMC und NHMC mit im Labor etablierten anderen Zellkulturen, der Primärzelle HUVEC und der Zelllinie HBMEC verglichen. Bezüglich des AT₁-Rezeptors schienen die Primärkulturen BSMC, NHMC und HUVEC eine gleiche, niedrige Expression zu besitzen, HBMEC eine deutlich höhere. AT₂-Rezeptoren schienen demgegenüber v.a. auf Mesangiumzellen verstärkt nachweisbar, weitaus weniger in BSMC, HUVEC und HBMEC. Gesetzt den Fall, man möchte Versuche mit einer Zelle unternehmen, die sich einerseits durch eine hohe AT₁-Rezeptorexpression bei gleichzeitig niedriger AT₂-Rezeptordichte auszeichnet, böten sich hierfür folglich HBMEC an.

4.2.3 Die Rolle des AT₁- und AT₂-Rezeptors im Zellzyklus

Die Effekte von Angiotensin II werden über spezifische Rezeptoren (AT₁ und AT₂) vermittelt, wobei bislang vor allem der AT₁-Rezeptor genauer charakterisiert werden konnte. Dennoch sollen hier auch die Auswirkungen einer Aktivierung des AT₂-Rezeptors in Hinblick auf mögliche antagonistische Wirkungen genauer beleuchtet werden.

Angiotensin II führt über die Bindung an den AT₁-Rezeptor sowohl in vaskulären Myozyten¹⁵⁷ als auch in Mesangiumzellen zu Veränderungen im Zellzyklus. Diese Vorgänge werden über von der NADPH-Oxidase gebildete O₂⁻-Radikale vermittelt. Dosisabhängig führt die Angiotensin II-Inkubation entweder zu Proliferation oder Hypertrophie⁷⁵. In beiden Versuchsansätzen ließ sich mit den MAP-Kinasen ein weiterer Schritt in der Signalkaskade identifizieren. Auch apoptotische Effekte, die über oxidativen Stress vermittelt sind, wurden für den AT₁-Rezeptor nachgewiesen¹⁵⁸.

Seshiah konnte die Generierung von ROS durch Angiotensin II, die in diesen Vorgängen eine bedeutende Stellung einnimmt, genauer charakterisieren. Sie lässt sich in zwei Phasen unterteilen, eine schnelle erste Phase, die Protein-kinase C vermittelt bereits nach 30 Sekunden zum Anstieg von ROS führt. Die zweite Phase, die nach ca. 30 Minuten nachweisbar ist, ist stark NADPH-Oxidase abhängig¹⁵⁹, genauer gesagt ist sie abhängig von der Aktivierung einer kleinen Untereinheit der NADPH-Oxidase, der GTPase Rac1¹⁶⁰. Dass

diese GTPase eine Schlüsselrolle in Zellzyklusentscheidungen einnehmen und damit unter anderem zur Proliferation führen kann, wurde bereits 1997 beschrieben ¹⁶¹.

Angiotensin II-Wirkungen, die AT₁-vermittelt zur Hypertrophie von Zellen führen, konnten einem weiteren Eckpfeiler in der Signalkaskade zugeordnet werden. Die Expression des Zyklinkinaseinhibitors p27^{kip1} wird sowohl in SMC ¹⁶² als auch in Tubuluszellen der Niere ⁷⁶ durch die Generierung von ROS gesteigert, was einen Arrest im Zellzyklus bedingt.

Jedoch nicht nur Rac1 als ein Mitglied der GTPasen-Familie scheint an den komplexen Angiotensin II-Wirkungen beteiligt zu sein, sondern auch das bereits angesprochene RhoA. In Kontraktionsversuchen konnte in Kaninchenaortenringen die Angiotensin II induzierte Vasokontraktion mit dem Rho-Kinase-Inhibitor y27632 deutlich abgeschwächt werden ¹⁰³. Auch für Mesangiumzellen konnten RhoA-Wirkungen belegt werden ¹⁶³.

Die Bindung von Angiotensin II an den AT₁-Rezeptor führt also zu einer Generierung von Superoxidanionen, die zeitabhängig in zwei Phasen aufgeteilt werden kann. An verschiedenen Stellen der Zellzyklusregulation, aber auch der Kontraktibilität, konnte bislang eine AT₁-Beteiligung nachgewiesen werden, jedoch steht die endgültige Erklärung der unterschiedlichen Signalwege zum aktuellen Zeitpunkt noch aus.

Um das Verständnis der Angiotensin II-Wirkungen zu spezifizieren, muss auch der AT₂-Rezeptor betrachtet werden. In adulten Zellen ist er bei weitem nicht so genau charakterisiert wie der AT₁-Rezeptor, trotzdem lassen sich einige grundlegende Prinzipien seiner Wirkungsweise darstellen.

Wie bereits angesprochen ist die O₂⁻-Produktion über die NADPH-Oxidase ein ausschlaggebender Schritt in der Angiotensin II-Wirkung. Die Aktivierung des AT₂-Rezeptors kann funktionell diese Superoxidanionenfreisetzung antagonisieren ¹⁶⁴. Eine mögliche Erklärung lieferten Seebach ⁷⁴ und Horiuchi ⁷⁵, die einen antagonistischen Crosstalk auf Ebene von STAT beschrieben. So ist der über den AT₂-Rezeptor aktivierte STAT 1 dazu in der Lage, die Phosphorylierung von STAT 1α/β, 2 und 3 zu hemmen, die neben STAT 5 die AT₁-Wirkungen vermit-

teln. Zudem sind antiproliferative und Apoptose induzierende Effekte, aber auch die gesteigerte Produktion von extrazellulärer Matrix auf AT₂-Effekte zurückzuführen. Auch was die Kontraktionsbeeinflussung betrifft, sind die Auswirkungen des AT₂-Rezeptors vielfältig und nicht gänzlich geklärt. Neben vasokonstriktori-schen Effekten überwiegt wohl eine NO vermittelte Vasodilatation, auch hier also eine dem AT₁-Rezeptor gegenüber antagonistische Wirkung¹⁶⁵.

In der Zusammenschau dieser Erkenntnisse lässt sich somit die fehlende Proliferation in den vorliegenden Versuchsansätzen mit BSMC und NHMC wenigstens teilweise erklären. Die niedrige Basisexpression des AT₁-Rezeptors in den verwendeten Zellpassagen, die sich in höheren Passagen zudem noch weiter verringert, kann für sich selbst nicht zu einer starken proliferationssteigernden Wirkung führen. Der mögliche geringe Effekt könnte durch die relativ hohe AT₂-Rezeptordichte antagonisiert werden.

Weshalb allerdings die Inkubation mit verschiedenen Agenzien die AT₁-Rezeptordichte nicht steigern konnte, bleibt unklar. Dennoch wären in Zukunft Versuche mit dem sensitiven MTT-Proliferations-Assay interessant, die beispielsweise an jungen Mesangiumzellen oder an HBMEC durchgeführt werden. Diese sollten entweder nativ unter Hemmung des AT₂-Rezeptors mit PD 123319 oder des AT₁-Rezeptor mit einem „Sartan“ erfolgen, oder nach Überexpression des AT₁-Rezeptors mittels Transfektion. Auch eine Expressionshemmung des AT₂-Rezeptors durch siRNA erscheint denkbar. Weiterführend könnten diesbezüglich die beteiligten Signalwege über Rac1 und RhoA untersucht werden.

4.3 Interaktion von LDL und Angiotensin II

4.3.1 Modifikation der Einzeleffekte

Primäres Ziel dieser Arbeit war es, nach Erstellung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen für die Einzelsubstanzen Angiotensin II und atherogene Lipoproteine die Proliferation hinsichtlich einer gemeinsamen Inkubation zu überprüfen und die erwartete Potenzierung der Einzeleffekte zu quantifizieren.

Die Ergebnisse sowohl in den BSMC als auch den NHMC sind jedoch äußerst kritisch zu werten: Ein Teil der Problematik wurde bereits für die Einzelinkubation mit Angiotensin II diskutiert, ein anderer Teil soll hier nur beispielhaft aufgeführt werden.

- 1) Führte in BSMC die Koinkubation mit 100 nM Angiotensin II und 5 µg/ml oxLDL zu einer deutlichen Steigerung der Proliferation, so bewirkte die gleiche Dosis Angiotensin II bei 10 µg/ml oxLDL keinerlei Effekt.
- 2) 100 nM Angiotensin II schien in den gleichen Zellen bei Inkubation mit nativen LDL zu einer Reduktion der Proliferation zu führen.
- 3) Die gleichen Inkubationsansätze in NHMC dagegen zeigten komplett gegensätzliche Effekte.

Es ergaben sich unter den vorherrschenden Versuchsvoraussetzungen weder einheitliche Ergebnisse, noch ein einheitlicher Trend in den untersuchten Inkubationsdosierungen und Kombinationen.

Aus den bisher dargestellten Grundlagen sind die Wirkungen beider Substanzen über ihre spezifischen Rezeptoren und teilweise gemeinsamen, teilweise antagonistisch wirkenden Signalkaskaden komplex miteinander verknüpft, so dass in weiteren Versuchen einige Aspekte verändert werden sollten, um die Effekte voneinander trennen bzw. um einheitliche Versuchsbedingungen schaffen zu können.

Die Proliferationsmessungen sollten konsequent mit Hilfe des MTT-Assays erfolgen, um nicht durch hohe Standardabweichungen mögliche schwache Effekte zu „übersehen“. Es sollten Zellen verwendet werden, die sich durch eine hohe AT₁- bei gleichzeitig niedriger AT₂-Rezeptor-Expression auszeichnen. Diese könnten entweder „junge“ Populationen von NHMC darstellen oder möglicher-

weise die Zelllinie HBMEC. Hemmungen beider Angiotensin II-Rezeptoren durch ein „Sartan“ bzw. PD 123319 sollten dann die Beteiligung der jeweiligen rezeptorvermittelten Wege detektieren können. Des Weiteren erscheinen auch hier Überexpressionsmodelle mit Hilfe von Transfektionen einen vielversprechenden Ansatzpunkt zu bieten, lassen sich doch mittels verschiedener Konstrukte bestimmte Signalschritte oder Rezeptoren spezifisch untersuchen.

Mittlerweile konnte die postulierte Potenzierung der Proliferationssteigerung durch kombinierte Inkubation mit Angiotensin II und atherogenen Lipoproteinen sowohl in vaskulären Myozyten ¹⁶⁶ als auch in Mesangiumzellen ¹⁶⁷ nachgewiesen werden. In beiden Zellarten wurde dieser Effekt durch die Freisetzung von ROS bewirkt und konnte durch ein Sartan gehemmt werden und erwies sich somit als AT₁-Rezeptor vermittelt.

Auch der in den vorliegenden Versuchen beobachtete Proliferationsunterschied zwischen „jungen“ und „alten“ Mesangiumzellen konnte genauer untersucht werden. Die Arbeitsgruppe um Okada isolierte Mesangiumzellen von diabetischen Ratten nach 12 bis 14 bzw. nach 48 bis 50 Wochen. Die „jungen“ Zellen zeigten eine deutlich erhöhte Proliferationsrate auf Inkubation mit nativen und oxidierten LDL gegenüber den „alten“ Zellen. Ebenso verhielt sich die DNA-Neusynthese nach Inkubation mit Angiotensin II. Leider wurden diesbezüglich weder die Rezeptoren charakterisiert, noch wurde eine Koinkubation mit beiden Substanzen untersucht. Bemerkenswert ist, dass die „alten“ Mesangiumzellen sowohl auf Angiotensin II als auch auf LDL mit einer im Vergleich zu den „jungen“ Zellen vermehrten Bildung von extrazellulärer Matrix reagierten ¹⁶⁸, ein Effekt, der möglicherweise auf einer gesteigerten Expression des AT₂-Rezeptors beruht ¹⁶⁵.

4.3.2 **Therapeutische Ansätze**

Angiotensin II und atherogene Lipoproteine weisen also Synergismen auf, die die Entstehung und Progression von Athero- und Glomerulosklerose begünstigen und unterhalten. Auch klinische Studien erlauben die Schlussfolgerung, dass eine kombinierte Hemmung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems

mit einer Behandlung mit einem „Statin“ positive Auswirkungen auf die endotheliale Funktion und die Gesamtsterblichkeit in einem kardiovaskulären Risikokollektiv hat ^{140,144}. Dieser Effekt beruht einerseits zu einem großen Anteil auf der blutdrucksenkenden Wirkung des ACE-Hemmers, einem eigenständigen Risikofaktor bezüglich der Ausbildung einer Atherosklerose. Andererseits kann die ausführlich diskutierte spezifische Hemmung der Angiotensin II-Wirkungen die „gefäßprotektiven“ Effekte steigern.

Ebenso kann mit Hilfe einer Statin-Behandlung das Serum-LDL deutlich gesenkt werden, auch dies ein separater Arterioskleroserisikofaktor. Interessanterweise konnten zusätzliche Wirkungen charakterisiert werden, die von der alleinigen LDL-Senkung unabhängig waren.

Diabetische Ratten wurden mit einem Sartan und einem Statin bzw. mit den jeweiligen Einzelsubstanzen behandelt und die Nierenfunktion im Verlauf untersucht. Jeder Effekt der Einzelsubstanzen wurde durch die kombinierte Therapie noch potenziert, was mit einem niedrigeren Serumkreatinin und -harnstoff bzw. einer verminderten Albuminurie einherging. Diese Effekte waren unabhängig von den gemessenen LDL-Spiegeln ¹⁶⁹. Eine vergleichbare Auswirkung wurde durch eine Kombinationstherapie mit einem ACE-Hemmer und einem Statin in Ratten mit schwerer Nephropathie beobachtet. Auch hier zeigte sich diese Medikation den jeweiligen Monotherapien deutlich überlegen, eine signifikante Korrelation zwischen Ausmaß der Proteinurie und des Serumcholesterins konnte jedoch zusätzlich beobachtet werden ¹⁷⁰.

Diese Effekte der Statine, also protektive Wirkungen unabhängig von der LDL-Senkung, werden „pleiotrope Effekte“ genannt. Die Wissenschaft beschäftigt sich nun damit, diese genauer zu charakterisieren. Für unsere Fragestellung ist natürlich die Beeinflussung der diskutierten Signalwege interessant.

In Endothelzellen konnten Statine die Superoxidanionen-Freisetzung durch die NADPH-Oxidase im Sinne eines antioxidativen Wirkungspotentials reduzieren, indem sie die Expression der NADPH-Oxidase reduzierten ¹⁷¹. In vaskulären Gefäßmuskelzellen wurden die Angiotensin II vermittelten Effekte mit Hilfe von Koinkubationen mit einem Sartan und einem Statin untersucht. Auch hier konnten die AT₁ vermittelten Wirkungen über den STAT-Signalweg, Rac1 und

ERK/MAP-Kinasen durch das Statin wirkungsvoll reduziert, eine „Sartan bedingte“ Hemmung durch das Statin noch potenziert werden¹⁷². Auch die Beteiligung des RhoA-Pathways konnte in Mesangiumzellen durch Statine belegt werden, indem sie die RhoA vermittelte Proliferation verringerten¹⁷³.

Die Hemmung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und die Behandlung mit einem Statin bewirkt also in verschiedensten Schritten der Signalkaskade von athero- und glomerulosklerotischen Vorgängen protektive Auswirkungen. Die kombinierte Behandlung kann die jeweiligen Einzeleffekte wohl potenzieren, und scheint zusätzlich zur Blutdrucksenkung durch RAAS-Inhibitoren und der LDL-Senkung durch Statine andere Wirkungen zu haben, die für die Statine als „pleiotrope Effekte“ beschrieben wurden.

5 Zusammenfassung

An der Entstehung von Athero- und Glomerulosklerose sind Angiotensin II und atherogene Lipoproteine maßgeblich beteiligt. Sowohl klinische Studien als auch experimentelle Beobachtungen weisen auf eine Interaktion beider Substanzen hin. Effekte der singulären Inkubationen können durch eine gleichzeitige Gabe potenziert werden.

Vor diesem Hintergrund sollten in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen von Angiotensin II und nativen und oxidierten Low Density Lipoproteinen auf den Zellzyklus von kultivierten vaskulären Gefäßmuskelzellen und Mesangiumzellen im Sinne einer Proliferationsänderung untersucht werden. Sowohl die Effekte der Einzelinkubationen als auch der kombinierten Inkubationen sollten quantifiziert werden. Die Interaktion von oxidierten LDL mit den Zellen sollte mittels Fluoreszenzmarkierung sichtbar und messbar gemacht werden. Zusätzlich sollte die Expression der beteiligten Rezeptoren (LOX-1, AT₁ und AT₂) auf den verwendeten Zellen untersucht werden.

Sowohl native als auch oxidierte LDL waren dazu in der Lage, die Proliferation in BSMC und NHMC zu steigern. Das Maximum lag im Tritiumeinbau bei Myozyten bei ca. 450% bezogen auf die Kontrollzellen bei 10 µg/ml natLDL, und bei ca. 350% bei 20 µg/ml oxLDL. In NHMC fiel der Anstieg der Proliferation weniger stark aus, ca. 150% bei 30 µg/ml natLDL und ca. 180% bei 3 µg/ml oxLDL. Im MTT-Assay konnten signifikante Dosis-Wirkungs-Beziehungen erstellt werden, jedoch mit einer geringeren absoluten Proliferationssteigerung (BSMC 120%, NHMC 140%). Fluoreszenzmarkierte oxLDL wurden über Endozytose in einem konzentrations- und zeitabhängigen Prozess mit einer Sättigung nach ca. 14 Stunden in die Zellen aufgenommen. Der oxLDL-spezifische LOX-1-Rezeptor konnte jederzeit nachgewiesen werden.

Unter den vorliegenden Versuchsbedingungen konnte keine Proliferationssteigerung durch Angiotensin II gezeigt werden, weshalb auch die kombinierte Inkubation der Zellen mit Angiotensin II und atherogenen Lipoproteinen keine sig-

nifikanten Ergebnisse erbrachte. Die fehlende bzw. sehr unterschiedliche Wirkung durch Angiotensin II lässt sich über die Expression der beteiligten Rezeptoren erklären. War gerade in Zellen in höheren Passagen der proliferationsvermittelnde AT₁-Rezeptor kaum nachweisbar, so war in diesen Zellpopulationen der antagonistisch wirkende AT₂-Rezeptor stark exprimiert. Möglicherweise war die AT₁-Rezeptorexpression und die darüber vermittelten Effekte so gering, dass sie mit dem angewendeten Testverfahren nicht detektiert werden konnten, und auch die spezifische Hemmung des Rezeptors mit Losartan keine signifikanten Änderungen erbrachte. Auch die Inkubation der Zellen mit Agenzien, die die AT₁-Rezeptordichte erhöhen sollten, erbrachte keine Veränderungen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass atherogene Lipoproteine zeit- und konzentrationsabhängig möglicherweise über eine LOX-1 vermittelte Endozytose den Zellzyklus im Sinne einer Proliferationssteigerung beeinflussen. Die uneinheitlichen und deshalb nicht signifikanten Angiotensin II-Effekte können durch die starken Expressionsschwankungen der antagonistisch wirkenden Angiotensin II-Rezeptor-Subtypen (AT₁ und AT₂) vor allem in unterschiedlich alten Zellpopulationen erklärt werden. Wodurch diese Expressionsveränderungen verursacht sind, bleibt offen, ebenso, ob diese Effekte im atherosklerotischen Plaque in vivo nachweisbar und von Bedeutung sind.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Silbernagl S, Lang F: Taschenatlas der Pathophysiologie, Thieme-Verlag Stuttgart/New York, 2. Auflage, 2005: 236 – 239
- 2 Silbernagl S, Lang F: ebd. 218 – 223
- 3 Silbernagl S, Lang F: ebd. 290 – 291
- 4 Drexler H, Zeiher AM: Endothelial function in human coronary arteries in vivo. Focus on hypercholesterolemia. *Hypertension* 18 (4 Suppl), 1991: II 90 – 99
- 5 Zeiher AM, Drexler H, Saubier B, Just H: Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans. Effects on age, atherosclerosis, hypercholesterolemia and hypertension. *J. Clin. Invest.* 92, 1993: 652 – 662
- 6 Ross R: Cell biology of atherosclerosis. *Annu. Rev. Physiol.* 57, 1995: 791 – 804
- 7 Steinberg D: Lipoproteins and atherosclerosis: A look back and a look ahead. *Arteriosclerosis* 3(4), 1983: 283 – 301
- 8 Oparil S, Oberman A: Nontraditional cardiovascular risk factors. *Am. J. Med. Sci.* 317(3), 1999: 193 – 207
- 9 Simon BC, Noll B, Maisch B: Endotheliale Dysfunktion – eine Bestandsaufnahme und Ansätze zur Therapie. *Herz* 24(1), 1999: 62 – 71
- 10 Smith EB: Transport, interactions and retention of plasma proteins in the intima: the barrier function of the internal elastic lamina. *Eur. Heart J.* 11(Suppl E), 1990: 72 – 81
- 11 Jessup W: Oxidized lipoproteins and nitric oxide. *Curr. Opin. Lipidol.* 7(5), 1996: 274 – 280
- 12 Steinberg D: Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J. Biol. Chem.* 272(34), 1997: 20963 – 20966
- 13 Dahlen GH: Lp(a) lipoprotein in cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 108(2), 1994: 111 – 126

- 14 Riis Hansen P, Kharazmi AK, Jauhiainen M, Ehnholm C: Induction of oxygen free radical generation in human monocytes by lipoprotein(a). *Eur. J. Clin. Invest.* 24(7), 1994: 497 – 499
- 15 Mitchell ME, Sidawy AN: The pathophysiology of atherosclerosis. *Semin. Vasc. Surg.* 11(3), 1998: 134 – 141
- 16 Huie RE, Padmaja S : The reaction of NO with superoxide. *Free Radic. Res. Comm.* 18(4), 1993: 195 – 199
- 17 Pryor WA, Squadrito GL: The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am. J. Physiol.* 268(5 Pt 1), 1995: L699 – L722
- 18 Halliwell B: The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis* 23(Suppl.1), 1993: 118 – 126
- 19 McQuaid KE, Keenan AK: Endothelial barrier dysfunction and oxidative stress: roles for nitric oxide? *Exp. Physiol.* 82(2), 1997: 369 – 376
- 20 Villa LM, Salas E, Darley-USmar VM, Radomski MW, Moncada S: Peroxynitrite induces both vasodilatation and impaired vascular relaxation in the isolated perfused rat heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 1994: 12383 – 12387
- 21 Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288(5789), 1980: 373 – 376
- 22 Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS, Chaudhuri G: Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 244(1), 1988: 181 – 189
- 23 Moncada S, Palmer RM, Higgs EA: The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension* 12(4), 1988: 365 – 372
- 24 Jin N, Packer CS, Rhoades RA: Reactive oxygen-mediated contraction in pulmonary arterial smooth muscle: cellular mechanisms. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 69(3), 1991: 383 – 388

- 25 Suzuki YJ, Ford GD: Superoxide stimulates IP₃-induced Ca²⁺ release from vascular smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol.* 262(1 Pt 2), 1992: H114 – H116
- 26 Mohazzab-H KM, Kaminski PM, Wolin MS: Lactate and PO₂ modulate superoxide anion production in bovine cardiac myocytes: potential role of NADH oxidase. *Circulation* 96(2), 1997: 614 – 620
- 27 Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG: Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J. Clin. Invest.* 97(8), 1996: 1916 – 1923
- 28 Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG: Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J. Clin. Invest.* 91, 1993: 2546 – 2551
- 29 Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS: Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radic. Biol. Med.* 28(9), 2000: 1387 – 1404
- 30 Caplan BA, Schwartz CJ: Increased endothelial cell turnover in areas of in vivo Evans Blue uptake in the pig aorta. *Atherosclerosis* 17(3), 1973: 401 – 417
- 31 Schächinger V, Zeiher AM: Atherogenesis – recent insights into basic mechanisms and their clinical impact. *Nephrol. Dial. Transplant* 17, 2002: 2055 – 2064
- 32 Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362(6423), 1993: 801 – 809
- 33 Salonen JT, Ylä-Herttuala S, Yamamoto R, Butler S, Korpela H, Salonen R, Nyyssonen K, Palinski W, Witztum JL: Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet* 339(8798), 1992: 883 – 887

- 34 Ylä-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Carew TE, Butler S, Witztum JL, Steinberg D: Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J. Clin. Invest.* 84, 1989: 1086 – 1095
- 35 Suzuki S, Takahashi H, Sato H, Takashima N, Arakawa M, Geiyo F: Significance of glomerular deposition of apolipoprotein(a) in various glomerulopathies. *Am. J. Nephrol.* 17(6), 1997: 499 – 504
- 36 Schlondorff D: Cellular mechanisms of lipid injury in the glomerulus. *Am. J. Kidney. Dis.* 22(1), 1993: 72 – 82
- 37 Gröne EF, Walli AK, Gröne HJ, Miller B, Seidel D: The role of lipids in nephrosclerosis and glomerulosclerosis. *Atherosclerosis* 107(1), 1994: 1 – 13
- 38 Drenckhahn D: Benninghof Anatomie – Mikroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie und Zellbiologie, Band 1, Urban & Fischer – Verlag München/Jena, 16. Auflage, 2003: 776
- 39 Greiber S, Kreusel M, Pavenstädt H, Schollmeyer P, Wanner C: Lipoprotein(a) induces glomerular superoxide anion production. *Nephrol. Dial. Transplant.* 12, 1997: 1330 – 1335
- 40 Galle J, Heinloth A, Schwedler S, Wanner C: Effect of HDL and atherogenic lipoproteins on formation of O_2^- and renin release in juxtaglomerular cells. *Kidney Int.* 51, 1997: 253 – 260
- 41 Sato H, Suzuki S, Ueno M, Shimada H, Karasawa R, Nishi S, Arakawa M: Localisation of apolipoprotein(a) and B-100 in various renal diseases. *Kidney Int.* 43(2), 1993: 430 – 435
- 42 Wolf G: Angiotensin as a renal growth promoting factor. *Adv. Exp. Med. Biol.* 377, 1995: 225 – 236
- 43 Diet F, Pratt RE, Berry GJ, Momose N, Gibbons GH, Dzau VJ: Increased accumulation of tissue ACE in human atherosclerotic coronary artery disease. *Circulation* 94(11), 1996: 2756 – 2767
- 44 Silbernagl S, Lang F: Taschenatlas der Pathophysiologie, Thieme-Verlag Stuttgart/New York, 2. Auflage, 2005: 210 – 211

- 45 Speth RC, Mei L, Yamamura HI: Angiotensin II receptor binding and actions in NG108-15 cells. *Pept. Res* 2(3), 1989: 232 – 239
- 46 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(2 Pt 2), 1992: F236 – F240
- 47 Whitebread S, Mele M, Kamber B, de Gasparo M: Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163(1), 1989: 284 – 291
- 48 Nickenig G, Sachinidis A, Michaelsen F, Böhm M, Seewald S, Vetter H: Upregulation of vascular angiotensin II receptor gene expression by low density lipoprotein in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 95, 1997: 473 – 478
- 49 Nickenig G, Jung O, Strehlow K, Zolk O, Linz W, Schölkens BA, Böhm M: Hypercholesterolemia is associated with enhanced angiotensin AT1-receptor expression. *Am J. Physiol* 272(6 Pt 2), 1997: H2701 – H2707
- 50 Nickenig G, Röling J, Strehlow K, Schnabel P, Bohm M: Insulin induces upregulation of vascular AT1 receptor gene expression by posttranscriptional mechanisms. *Circulation* 98, 1998: 2453 – 2460
- 51 Sato A, Suzuki H, Murakami M, Nakazato Y, Iwaita Y, Saruta T: Glucocorticoid increases angiotensin II type 1 receptor and its gene expression. *Hypertension* 23(1), 1994: 25 – 31
- 52 Lassegue B, Alexander RW, Nickenig G, Clark M, Murphy TJ, Griending KK: Angiotensin II down-regulates the vascular smooth muscle AT1 receptor by transcriptional and post-transcriptional mechanisms: evidence for homologous and heterologous regulation. *Mol. Pharmacol.* 48(4), 1995: 601 – 609
- 53 Ichiki T, Usui M, Kato M, Funakoshi Y, Ito K, Egashira K, Takeshita A: Downregulation of angiotensin II type 1 receptor gene transcription by nitric oxide. *Hypertension* 31(1 Pt 2), 1998: 342 – 348

- 54 Dudley DT, Panek RL, Major TC, Lu GH, Bruns RF, Klinkefus BA, Hodges JC, Weishaar RE: Subclasses of angiotensin II binding sites and their functional significance. *Mol. Pharmacol.* 38(3), 1990: 370 – 377
- 55 Pucell AG, Hodges JC, Sen I, Bumpus FM, Husain A: Biochemical properties of the ovarian granulosa cell type 2-angiotensin II receptor. *Endocrinology* 128(4), 1991: 1947 – 1959
- 56 Grady EF, Sechi LA, Griffin CA, Schambelan M, Kalinyak JE: Expression of AT₂ receptors in the developing rat fetus. *J. Clin. Invest* 88, 1991: 921 – 933
- 57 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(3 Pt 1), 1997: 358 – 362
- 58 Janiak P, Pillon A, Prost JF, Vilaine JP: Role of angiotensin subtype 2 receptor in neointima formation after vascular injury. *Hypertension* 20(6), 1992: 737 – 745
- 59 Matsubara H, Inada M: Molecular insights into angiotensin II type 1 and type 2 receptors: expression, signaling and physiological function and clinical application of its antagonists. *Endocr.J.* 45(2), 1998: 137 – 150
- 60 Takeuchi K: Signal transduction systems of angiotensin II receptors. *Nippon Rinsho.* 57(5), 1999: 1070 – 1077
- 61 Morton JJ, Beattie EC, MacPherson F: Angiotensin II receptor antagonist Losartan has persistent effects on blood pressure in the young spontaneously hypertensive rat: lack of relation to vascular structure. *J. Vasc. Res.* 29(3), 1992: 264 – 269
- 62 Mancini GBJ, Henry GC, Macaya C, O'Neill BJ, Pucillo AL, Carere RG, Wargovich TJ, Mudra H, Luscher TF, Klibaner MI, Haber HE, Uprichard ACG, Pepine CJ, Pitt B: Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease – The TREND (Trial on Reversing ENdothelial Dysfunction) study. *Circulation* 94, 1996: 258 – 265

- 63 D'Uscio LV, Shaw S, Barton M, Luscher TF: Losartan but not Verapamil inhibits angiotensin II-induced tissue endothelin-1 release: role of bloodpressure and endothelial function. *Hypertension* 31, 1998: 1305 – 1310
- 64 Rajagopalan S, Laursen JB, Borthayre A, Kurz S, Keiser J, Haleen S, Giaid A, Harrison DG: Role for endothelin-1 in angiotensin II mediated hypertension. *Hypertension* 30 (1 Pt 1), 1997: 29 – 34
- 65 Haberl RL, Anneser F, Villringer A, Einhaupl KM: Angiotensin II induces endothelium-dependent vasodilation of rat cerebral arterioles. *Am. J. Physiol.* 258(6 Pt 2), 1990: H1840 – H1846
- 66 Sosa-Canache B, Cierco M, Gutierrez CI, Israel A: Role of bradykinins and nitric oxide in the AT₂ receptor-mediated hypotension. *J. Hum. Hypertens* 14 (Suppl.1), 2000: S40 – S46
- 67 Chen L, McNeill JR, Wilson TW, Gopalakrishnan V: Heterogeneity in vascular smooth muscle responsiveness to angiotensin II. Role of endothelin. *Hypertension* 26(1), 1995: 83 – 88
- 68 Darley-Usmar V, Halliwell B: Blood radicals: reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system. *Pharm. Res.* 13(5), 1996: 649 – 662
- 69 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(6), 1994: 1141 – 1148
- 70 Zhang H, Schmeisser A, Garlich CD, Plötze K, Damme U, Mügge A, Daniel WG: Angiotensin II-induced superoxide anion generation in human vascular endothelial cells: Role of membrane-bound NADH-/NADPH-oxidases. *Cardiovasc. Res.* 44, 1999: 215 – 222
- 71 Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK: p22^{phox} is a critical component of the superoxide-generating NADH-/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 271(38), 1996: 23317 – 23321

- 72 Berk BC, Vekshtein V, Gordon HM, Tsuda T: Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 13(4), 1989: 305 – 314
- 73 De Gasparo M, Siragy HM: The AT2 receptor: fact, fancy and fantasy. *Regul. Pept.* 81(1-3), 1999: 11 – 24
- 74 Seebach FA, Welte T, Fu XY, Block LH, Kashgarian M: Differential activation of the STAT pathway by angiotensin II via angiotensin type 1 and type 2 receptors in cultured human fetal mesangial cells. *Experimental and Molecular Pathology* 70, 2001: 265 – 273
- 75 Horiuchi M, Hayashida W, Akishita M, Tamura K, Daviet L, Lehtonen JYA, Dzau VJ: Stimulation of different subtypes of angiotensin II receptors, AT1 and AT2 receptors, regulates STAT activation by negative crosstalk. *Circ. Res.* 84, 1999: 876 – 882
- 76 Hannken T, Schroeder R, Stahl RAK, Wolf G: Angiotensin II-mediated expression of p27^{kip1} and induction of cellular hypertrophy in renal tubular cells depend on the generation of oxygen radicals. *Kidney Int.* 54, 1998: 1923 – 1933
- 77 Jaimes EA, Galceran JM, Raji L: Angiotensin II induces superoxide anion production by mesangial cells. *Kidney Int.* 54, 1998): 775 – 784
- 78 Orth SR, Weinreich T, Bonisch S, Weih M, Ritz E: Angiotensin II induces hypertrophy and hyperplasia in adult human mesangial cells. *Exp. Nephrol.* 3(1), 1995: 23 – 33
- 79 Bell L, Madri JA: Influence of the angiotensin system on endothelial and smooth muscle cell migration. *Am. J. Pathol.* 137(1), 1990: 7 – 12
- 80 Grafe M, Auch-Schwelk W, Zakrzewicz A, Regitz-Zagrosek V, Bartsch P, Graf K, Loebe M, Gaehtgens P, Fleck E: Angiotensin II-induced leukocyte adhesion on human coronary endothelial cells is mediated by E-selectin. *Circ. Res.* 81(5), 1997: 804 – 811
- 81 Pueyo ME, Gonzalez W, Nicoletti A, Savoie F, Arnal JF, Michel JB: Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor- κ B activation induced by intracellular oxidative stress. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 2000: 645 – 651

- 82 Hahn AW, Jonas U, Buhler FR, Resink TJ: Activation of human peripheral monocytes by angiotensin II. *FEBS Lett.* 347(2-3),1994: 178 – 180
- 83 Kato H, Suzuki H, Tajima S, Ogata Y, Tominaga T, Sato A, Saruta T: Angiotensin II stimulates collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *J. Hypertens* 9(1), 1991: 17 – 22
- 84 Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA: Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor- β expression in rat glomerular mesangial cells. *J. Clin. Invest* 93, 1994: 2431 – 2437
- 85 Singh R, Alavi N, Singh AK, Leehey DJ: Role of angiotensin II in glucose-induced inhibition of mesangial matrix degradation. *Diabetes* 48, 1999: 2066 - 2073
- 86 Silbernagl S, Lang F: Taschenatlas der Pathophysiologie, Thieme-Verlag Stuttgart/New York, 2. Auflage, 2005: 246 – 249
- 87 Tyroler HA: Review of lipid-lowering clinical trials in relation to observational epidemiologic studies. *Circulation* 76(3), 1987: 515 – 522
- 88 Goldstein JL, Brown MS: Regulation of low-density lipoprotein receptors: implications for pathogenesis and therapy of hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Circulation* 76(3), 1987: 504 – 507
- 89 Daugherty A, Zweifel BS, Sobel BE, Schonfeld G: Isolation of low density lipoprotein from atherosclerotic vascular tissue of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Arteriosclerosis* 8(6), 1988: 768 – 777
- 90 Janabi M, Yamashita S, Hirano K, Sakai N, Hiraoka H, Matsumoto K, Zhang Z, Nozaki S, Matsuzawa Y: Oxidized LDL-induced NF- κ B activation and subsequent expression of proinflammatory genes are defective in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 2000: 1953 – 1960
- 91 Steinberg D: Lipoproteins and the pathogenesis of atherosclerosis. *Circulation* 76(3), 1987: 508 – 514
- 92 Steinbrecher UP: Role of superoxide in endothelial-cell modification of low density lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 959(1), 1988: 20 – 30

- 93 Darley-USmar VM, Hogg N, O'Leary VJ, Wilson MT, Moncada S: The simultaneous generation of superoxide and nitric oxide can initiate lipid peroxidation in human low density lipoprotein. *Free Radic. Res. Commun* 17(1), 1992: 9 – 20
- 94 Esterbauer H, Ramos P: Chemistry and pathophysiology of oxidation of LDL. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 127, 1996: 31 – 64
- 95 Daugherty A, Dunn JL, Rateri DL, Heinecke JW: Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J. Clin. Invest.* 94, 1994: 437 – 444
- 96 Belkner J, Stender H, Kuhn H: 15-Lipoxygenase preferentially oxygenates a subfraction of human low density lipoprotein. *Adv. Exp. Med. Biol.* 407, 1997: 465 – 469
- 97 Yokoyama M, Hirata K, Miyake R, Akita H, Ishikawa Y, Fukazaki H: Lysophosphatidylcholine: essential role in the inhibition of endothelium-dependent vasorelaxation by oxidized low density lipoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 168(1), 1990: 301 – 308
- 98 Muller K, Carpenter KL, Mitchinson MJ: Cell-mediated oxidation of LDL: comparison of different cell types in the atherosclerotic lesion. *Free Radic. Res.* 29(3), 1998: 207 – 220
- 99 Aviram M, Rosenblat M: Macrophage-mediated oxidation of extracellular low density lipoprotein requires an initial binding of the lipoprotein to its receptor. *J. Lipid. Res.* 35, 1994: 385 – 398
- 100 Scheuer H, Gwinner W, Hohbach J, Groene EF, Brandes RP, Malle E, Olbricht CJ, Walli AK, Groene HJ: Oxidant stress in hyperlipidemia-induced renal damage. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 278, 2000: F63 – F74
- 101 Ong AC, Moorhead JF: Tubular lipidosis: epiphenomenon or pathogenetic lesion in human renal disease? *Kidney Int.* 45(3), 1994: 753 – 762
- 102 Shiode N, Kato M, Hiraoka A, Yamagata T, Matsuura H, Kajiyama G: Impaired endothelium-dependent vasodilation of coronary resistance vessels in hypercholesterolemic patients. *Intern. Med.* 35(2), 1996: 89 – 93

- 103 Galle J, Mameghani A, Bolz SS, Gambaryan S, Görg M, Quaschnig T, Raff U, Barth H, Seibold S, Wanner C, Pohl U: Oxidized LDL and its compound lysophosphatidylcholine potentiate AngII-induced vasoconstriction by stimulation of RhoA. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14(6), 2003: 1471 – 1479
- 104 Fogliatto G, Musanti R, Pirillo A, Ghiselli G: Oxidized lipoproteins induce long-lasting inhibition of nitric oxide synthase from a murine endothelioma cell line (bEnd.4). *J. Cardiovasc. Risk* 2(2), 1995: 123 – 130
- 105 Galle J, Bassenge E: Effects of native and oxidized low-density lipoproteins on endothelium-dependent and endothelium-independent vasomotion. *Basic Res. Cardiol.* 86 (Suppl.2), 1991: 127 – 142
- 106 Galle J, Bassenge E, Busse R: Oxidized low density lipoproteins potentiate vasoconstrictions to various agonists by direct interaction with vascular smooth muscle. *Circ. Res.* 66, 1990: 1287 – 1293
- 107 Galle J, Bauersachs J, Busse R, Bassenge E: Inhibition of cyclic AMP- and cyclic GMP-mediated dilations in isolated arteries by oxidized low density lipoproteins. *Arterioscler. Thromb.* 12, 1992: 180 – 186
- 108 Horio T, Kohno M, Yasunari K, Murakawa K, Yokokawa K, Ikeda M, Fukui T, Takeda T: Stimulation of endothelin-1 release by low density and very low density lipoproteins in cultured human endothelial cells. *Atherosclerosis* 101(2), 1993: 185 – 190
- 109 Galle J, Schneider R, Winner B, Lehmann-Bodem C, Schinzel R, Münch G, Conzelmann E, Wanner C: Glyc-oxidized LDL impair endothelial function more potently than oxidized LDL: role of enhanced oxidative stress. *Atherosclerosis* 138, 1998: 65 – 77
- 110 Galle J, Schneider R, Heinloth A, Wanner C, Galle PR, Conzelmann E, Dimmeler S, Heermeier K: Lp(a) and LDL induce apoptosis in human endothelial cells and in rabbit aorta: Role of oxidative stress. *Kidney Int.* 55, 1999: 1450 – 1461
- 111 Hsieh CC, Yen MH, Yen CH, Lau YT: Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis via generation of reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc. Res.* 49, 2001: 135 – 145

- 112 Weiss SJ, King GW, LoBuglio AF: Superoxide generation by human monocytes and macrophages. *Am. J. Hematol.* 4(1), 1978: 1 – 8
- 113 Kugiyama K, Sugiyama S, Ogata N, Oka H, Doi H, Ota Y, Yasue H: Burst production of superoxide anion in human endothelial cells by lysophosphatidylcholine. *Atherosclerosis* 143, 1999: 201 – 204
- 114 Ohara Y, Peterson TE, Zheng B, Kuo JF, Harrison DG: Lysophosphatidylcholine increases vascular superoxide anion production via protein kinase C activation. *Arterioscler. Thromb.* 14(6), 1994: 1007 – 1013
- 115 Ding G, Van Goor H, Ricardo SD, Orlowski JM, Diamond JR: Oxidized LDL stimulates the expression of TGF – β and fibronectin in human glomerular epithelial cells. *Kidney Int.* 51(1), 1997: 147 – 154
- 116 Heinloth A, Heermeier K, Raff U, Wanner C, Galle J: Stimulation of NADPH Oxidase by oxidized low-density lipoprotein induces proliferation of human vascular endothelial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11, 2000: 1819 – 1825
- 117 Yui S, Sasaki T, Miyazaki A, Horiuchi S, Yamazaki M: Induction of murine macrophage growth by modified LDLs. *Arterioscler. Thromb.* 13(3), 1993: 331 – 337
- 118 Lähteenmäki TA, Korpela R, Tikkanen MJ, Karjala K, Laakso J, Solantunturi E, Vapaatalo H: Proliferative effects of oxidized low-density lipoprotein on vascular smooth muscle cells: role of dietary habits. *Life Sci.* 63(12), 1998: 995 – 1003
- 119 Gupta S, Rifci V, Crowley S, Brownlee M, Shan Z, Schlondorff D: Interactions of LDL and modified LDL with mesangial cells and matrix. *Kidney Int.* 41(5), 1992: 1161 – 1169
- 120 Heermeier K, Leicht W, Palmeshofer A, Ullrich M, Wanner C, Galle J: Oxidized LDL suppresses NF- κ B and overcomes protection from apoptosis in activated endothelial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12, 2001: 456 – 463

- 121 Tashiro K, Makita Y, Shike T, Shirato I, Sato T, Cynshi O, Tomino Y: Detection of cell death of cultured mouse mesangial cells induced by oxidized low density lipoprotein. *Nephron* 82, 1999: 51 – 58
- 122 Seibold S, Schürle D, Heinloth A, Wolf G, Wagner M, Galle J: Oxidized LDL induces proliferation and hypertrophy in human umbilical endothelial cells via regulation of p27^{kip1} Expression: Role of RhoA. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15(12), 2004: 3026 – 3034
- 123 Saleh H, Schlatter E, Lang D, Pauels HG, Heidenreich S: Regulation of mesangial cell apoptosis and proliferation by intracellular Ca²⁺ signals. *Kidney Int.* 58(5), 2000: 1876 – 1884
- 124 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, 2001: 488 – 495
- 125 Morel DW, Chisolm GM: Antioxidant treatment of diabetic rats inhibits lipoprotein oxidation and cytotoxicity. *J. Lipid. Res.* 30, 1989: 1827 - 1834
- 126 Schwartz CJ, Kelley JL, Nerem RM, Sprague EA, Rozek MM, Valente AJ, Edwards EH, Prasad AR, Kerbacher JJ, Logan SA: Pathophysiology of the atherogenic process. *Am. J. Cardiol.* 64(13), 1989: 23G – 30G
- 127 Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ: Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature* 344(6263), 1990: 254 – 257
- 128 Kume N, Moriwaki H, Kataoka H, Minami M, Murase T, Sawamura T, Masaki T, Kita T: Inducible expression of LOX-1, a novel receptor für oxidized LDL, in macrophages and vascular smooth muscle cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 902, 2000: 323 – 327

- 129 Chen M, Masaki T, Sawamura T: LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Pharmacology & Therapeutics* 95, 2002: 89 – 100
- 130 Sawamura T, Kume N, Aoyama T, Moriwaki H, Hoshikawa H, Yuichi A, Tanaka T, Miwa S, Katsura Y, Kita T, Masaki T: An endothelial receptor for oxidized low density lipoprotein. *Nature* 386, 1997: 73 – 77
- 131 Cominacini L, Rigoni A, Pasini AF, Garbin U, Davoli A, Campagnola M, Pastorino AM, Lo Cascio V, Sawamura T: The binding of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) to ox-LDL receptor-1 reduces the intracellular concentration of nitric oxide in endothelial cells through an increased production of superoxide. *J. Biol. Chem.* 276(17), 2001: 13750 – 13755
- 132 Murase T, Kume N, Korenaga R, Ando J, Sawamura T, Masaki T, Kita T: Fluid shear stress transcriptionally induces Lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells. *Circ. Res.* 83, 1998: 328 – 333
- 133 Li L, Sawamura T, Renier G: Glucose enhances endothelial LOX-1 expression: Role for LOX-1 in glucose-induced human monocyte adhesion to endothelium. *Diabetes* 52, 2003: 1843 – 1850
- 134 Morawietz H, Rueckschloss U, Niemann B, Duerrschmidt N, Galle J, Hakim K, Zerkowski HR, Sawamura T, Holtz J: Angiotensin II induces LOX-1, the human endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Circulation* 100, 1999: 899 – 902
- 135 Hu B, Li D, Sawamura T, Mehta JL: Oxidized LDL through LOX-1 modulates LDL-receptor expression in human coronary artery endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 307, 2003: 1008 – 1012
- 136 Ohishi M, Ueda M, Rakugi H, Naruko T, Kojima A, Okamura A, Higaki J, Ogihara T: Relative localization of angiotensin-converting enzyme, chymase and angiotensin II in human coronary atherosclerotic lesions. *J. Hypertens.* 17(4), 1999: 547 – 553
- 137 Lee HS, Kim YS: Identification of oxidized low density lipoprotein in human renal biopsies. *Kidney Int.* 54, 1998: 848 – 856

- 138 Li D, Saldeen T, Romeo F, Mehta JL: Oxidized LDL upregulates Angiotensin II Type 1 receptor expression in cultured human coronary artery endothelial cells: The potential role of transcription factor NF- κ B. *Circulation* 102, 2000: 1970 – 1976
- 139 Li D, Singh RM, Liu L, Chen H, Singh BM, Kazzaz N, Mehta JL: Oxidized-LDL through LOX-1 increases the expression of angiotensin converting enzyme in human coronary artery endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* 57, 2003: 238 – 243
- 140 Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G for the HOPE investigators: Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, Ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study investigators. *N. Engl. J. Med.* 342(3), 2000: 145 – 153
- 141 Remuzzi G, Ruggenti P, Prico N: Chronic renal diseases: renoprotective benefits of renin-angiotensin system inhibition. *Ann. Intern. Med.* 136, 2002: 604 – 615
- 142 Pitt B, O'Neill B, Feldman R, Ferrari R, Schwartz L, Mudra H, Bass T, Pepine C, Texter M, Haber H, Uprichard A, Cashin-Hemphill L, Lees RS: The QUinapril Ischemic Event Trial (QUIET): Evaluation of chronic ACE inhibitor therapy in patients with ischemic heart disease and preserved left ventricular function. *Am. J. Cardiol.* 87, 2001: 1058 – 1063
- 143 Cashin-Hemphill L, Holmvang G, Chan RC, Pitt B, Dinsmore RE, Lees RS: Angiotensin-converting enzyme inhibition as antiatherosclerotic therapy: No answer yet. *Am. J. Cardiol.* 83, 1999: 43 – 47
- 144 Teo KK, Burton JR, Buller CE, Plante S, Catellier D, Tymchak W, Dzavik V, Taylor D, Yokoyama S, Montague TJ for the SCAT investigators: Long-term effects of cholesterol lowering and angiotensin-converting enzyme inhibition on coronary atherosclerosis – The Simvastatin/Enalapril Coronary Atherosclerosis Trial (SCAT). *Circulation* 102, 2000: 1748 – 1754
- 145 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193(1), 1951: 262 – 275

- 146 Galle J, Wanner C: Oxidized LDL and Lp(a): Preparation, modification and analysis. *Methods Mol. Biol.* 108, 1998: 119 – 130
- 147 Steinbrecher UP, Witztum JL, Parathasarathy S, Steinberg D: Decrease in reactive amino groups during oxidation or endothelial cell modification of LDL. Correlation with changes in receptor-mediated catabolism. *Arteriosclerosis* 7(2), 1987: 135 – 143
- 148 Stephan ZF, Yurachek EC: Rapid fluorometric assay of LDL receptor activity by DiI-labeled LDL. *J. Lipid Res.* 34, 1993: 325 – 330
- 149 Essler M, Retzer M, Bauer M, Heemskerk JW, Aepfelbacher M, Siess W: Mildly oxidized low density lipoprotein induces contraction of human endothelial cells through activation of Rho/Rho Kinase and inhibition of myosin light chain phosphatase. *J. Biol. Chem.* 274(43), 1999: 30361 – 30364
- 150 Salvayre R, Auge N, Benoist H, Negre-Salvayre A: Oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1585, 2002: 213 – 221
- 151 Sakurai K, Sawamura T: Stress and vascular responses: endothelial dysfunction via Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1: close relationships with oxidative stress. *J. Pharmacol. Sci.* 91, 2003: 182 – 186
- 152 Asmis R, Begley JG: Oxidized LDL promotes peroxide-mediated mitochondrial dysfunction and cell death in human macrophages: a caspase-3-independent pathway. *Circ. Res.* 92, 2003:e20 – e29
- 153 Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K: Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 273(5272), 1996: 245 – 248
- 154 Coso OA, Chiariello M, Yu JC, Teramoto H, Crespo P, Xu N, Miki T, Gutkind JS: The small GTP-binding proteins rac1 and cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* 81, 1995: 1137 – 1146

- 155 Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JA, Smith RD: Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol. Rev.* 45(2), 1993: 205 – 251
- 156 Fierens FLP, Vanderheyden PML, De Backer JP, Vauquelin G: Insurmountable angiotensin AT₁ receptor antagonists: the role of tight antagonist binding. *Eur. J. Pharmacol.* 372, 1999: 199 – 206
- 157 Laplante MA, Wu R, El Midaoui A, de Champlain J : NAD(P)H oxidase activation by angiotensin II is dependent on p42/44 ERK-MAPK pathway activation in rat's vascular smooth muscle cells. *J. Hypertens.* 21(5), 2003: 927 – 936
- 158 Lodha S, Dani D, Mehta R, Bhaskaran M, Reddy K, Ding G, Singhal PC: Angiotensin II-induced mesangial cell apoptosis: role of oxidative stress. *Mol. Med.* 8(12), 2002: 830 – 840
- 159 Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK: Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity – upstream mediators. *Circ. Res.* 91, 2002: 406 – 413
- 160 Babior BM: NADPH Oxidase: an update. *Blood* 93(5), 1999: 1464 – 1476
- 161 Moore KA, Sethi R, Doanes AM, Johnson TM, Pracyk JB, Kirby M, Irani K, Goldschmidt-Clermont PJ, Finkel T: Rac1 is required for cell proliferation and G2/M progression. *Biochem J.* 326, 1997: 17 – 20
- 162 Kubo A, Fukada N, Teng J, Satoh C, Nakayama M, Kishioka H, Kanmatsuse K: Angiotensin II regulates the cell cycle of vascular smooth muscle cells from SHR. *Am. J. Hypertens.* 13(10), 2000: 1117 – 1124
- 163 Shikata Y, Shikata K, Matsuda M, Sugimoto H, Wada J, Makino H: Signaling transduction pathway of angiotensin II in human mesangial cells: mediation of focal adhesion and GTPase activating proteins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 257, 1999: 234 – 238

- 164 Sohn HY, Raff U, Hoffman A, Gloe T, Heermeier K, Galle J, Pohl U: Differential role of angiotensin II receptor subtypes on endothelial superoxide formation. *British Journal of Pharmacology* 131, 2000: 667 – 672
- 165 Henrion D, Kubis N, Lévy BI: Physiological and pathophysiological functions of the AT₂ subtype receptor of angiotensin II: from large arteries to the microcirculation. *Hypertension* 38, 2001: 1150 – 1157
- 166 Watanabe T, Pakala R, Katagiri T, Benedict CR: Mildly oxidized low-density lipoprotein acts synergistically with angiotensin II in inducing vascular smooth muscle cell proliferation. *J. Hypertens.* 19(6), 2001: 1065 – 1073
- 167 Park SY, Song CY, Kim BC, Hong HK, Lee HS: Angiotensin II mediates LDL – induced superoxide generation in mesangial cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*, 285, 2003: F909 – F915
- 168 Okada M, Takemura T, Yanagida H, Yoshioka K: Response of mesangial cells to low-density lipoprotein and angiotensin II in diabetic (OLETF) rats. *Kidney Int.* 61, 2002: 113 – 124
- 169 Qin J, Zhang Z, Liu J, Sun L, Hu L, Cooper ME, Cao Z: Effects of the combination of an angiotensin II antagonist with an HMG-CoA reductase inhibitor in experimental diabetes. *Kidney Int.* 64(2), 2003: 565 – 571
- 170 Zoja C, Corna D, Rottoli D, Cattaneo D, Zanchi C, Tomasoni S, Abbate M, Remuzzi G: Effect of combining ACE inhibitor and statin in severe experimental nephropathy. *Kidney Int.* 61, 2002: 1635 – 1645
- 171 Rueckschloss U, Galle J, Holtz J, Zerkowski HR, Morawietz H: Induction of NAD(P)H oxidase by oxidized low-density lipoprotein in human endothelial cells – antioxidative potential of hydroxymethylglutaryl Co-enzyme A reductase inhibitor therapy. *Circulation* 104, 2001: 1767 – 1772

- 172 Horiuchi M, Cui TX, Li Z, Li JM, Nakagami H, Iwai M: Fluvastatin enhances the inhibitory effects of a selective angiotensin II type 1 receptor blocker, Valsartan, on vascular neointimal formation. *Circulation* 107, 2003: 106 – 112
- 173 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 signaling pathway: Implications for diabetic nephropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(12), 2002: 8301 – 8305

7 Abbildungsverzeichnis

- Abb.1: BSMC – Methodik (^3H -Thymidin-Einbau)
Abb.2: BSMC – Angiotensin II (^3H -Thymidin-Einbau)
Abb.3: BSMC – Lipoproteine (^3H -Thymidin-Einbau)
Abb.4: BSMC – Lipoproteine und Angiotensin II (^3H -Thymidin-Einbau)
Abb.5: NHMC – Methodik (^3H -Thymidin-Einbau)
Abb.6: NHMC – Angiotensin II (^3H -Thymidin-Einbau)
Abb.7: NHMC – Lipoproteine (^3H -Thymidin-Einbau)
Abb.8: NHMC – Lipoproteine und Angiotensin II (^3H -Thymidin-Einbau)
- Abb.9: BSMC – oxLDL (MTT-Assay)
Abb.10: BSMC – Angiotensin II (MTT-Assay)
Abb.11: NHMC – oxLDL (MTT-Assay)
Abb.12: NHMC – Angiotensin II (MTT-Assay)
- Abb.13: NHMC, AT₁-Rezeptor (Western Blot)
Abb.14: NHMC, AT₂-Rezeptor (Western Blot)
Abb.15: Passagen BSMC, NHMC, AT₁-Rezeptor (Western Blot)
Abb.16: Passagen BSMC, NHMC, AT₂-Rezeptor (Western Blot)
Abb.17: Zellarten, AT₁-Rezeptor (Western Blot)
Abb.18: Zellarten, AT₂-Rezeptor (Western Blot)
Abb.19: Zellarten, LOX-1-Rezeptor (Western Blot)
- Abb.20: BSMC – Dil-oxLDL-Kinetik, Vergr. 40-fach (Histochemie)
Abb.21: BSMC – Dil-oxLDL-Kinetik, Vergr. 63-fach (Histochemie)
- Abb.22: NHMC – Dil-oxLDL-Internalisierung (fluorometrische Messung)

8 Abkürzungsverzeichnis

³ H	Tritium
ACE	angiotensin converting enzyme
Ang II	Angiotensin II
AT ₁ -Rez.	Angiotensin II-Rezeptor Typ 1
AT ₂ -Rez.	Angiotensin II-Rezeptor Typ 2
BSA	bovine serum albumine
BSMC	bovine aortic smooth muscle cells
cGMP	cyclic guanin-mono-phosphate
GTP	guanin-tri-phosphate
CSF	colony stimulating factor
Dil-oxLDL	mit 3,3'-Dioctadecylindocarbocyanin markierte oxLDL
DNA	desoxyribonucleic acid
EDRF	endothelial derived relaxing factor
FCS	fetal calf serum
HBMEC	human brain microvascular endothelial cells
HOPE	Heart Outcome Prevention Evaluation
HRP	horse radish peroxidase
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IDL	Intermediate Density Lipoproteine
IL-1	Interleukin-1
LDL	Low Density Lipoproteine
Lp(a)	Lipoprotein (a)
LPC	Lysophosphatidylcholin
LOX-1-Rez.	Lectin-like oxLDL-Rezeptor-1
MAP-Kinase	mitogen activated protein-Kinase
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazid-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazoliumbromid
NAD(P)H	Nikotinamidadenindinukleotid(phosphat)
NHMC	normal human mesangial cells

NO	Stickstoffmonoxid
O ₂ ⁻	Superoxidanion
ONOO ⁻	Peroxinitrit
OxLDL	oxidierte Low Density Lipoproteine
PBS	phosphate buffered saline
PDGF	platelet derived growth factor
QUIET	QUinapril Ischemic Event Trial
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROS	reactive oxygen species
SCAT	Simvastatin/Enalapril Coronary Atherosclerosis Trial
siRNA	small interfering ribonucleic acid
SOD	Superoxiddismutase
STAT	signal transducer and activator of transcription
TGF β	transforming growth factor β
TNF α / β	tumor necrosis factor α / β
TREND	Trial on Reversal of ENdothelial Dysfunction
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VLDL	Very Low Density Lipoproteine

Danksagung

Herzlich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Jan Galle für die Bereitstellung des Themas und der Mittel für diese Arbeit, für seine Betreuung und für die stete Diskussionsbereitschaft und konstruktive Korrektur der Arbeit. Ebenso gilt Herrn Prof. Dr. med. Christoph Wanner Dank für die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Für die Unterstützung bei der Auswertung der Ergebnisse und die jederzeit vorhandene kritische Diskussionsbereitschaft und die Einarbeitung in Labortechniken verschiedenster Art danke ich Herrn Dr. med. Stefan Seibold. Auch danke ich Frau Elke Baumeister für die hervorragende Einarbeitung in die Zellkulturtechniken, Frau Marita Bartrow für die zeitaufwendige Unterstützung bei der Durchführung der Tritium-Assays, Frau Margarete Röder für die Präparation und Modifikation der LDL und allen Mitarbeitern im nephrologischen Labor, ohne deren Hilfsbereitschaft bei den alltäglichen Problemen in der Laborarbeit diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Lebenslauf

Martin Wagner

Geboren am 1.11.1973 in Rothenburg ob der Tauber

1980 – 1984	Grundschule Gebsattel-Insingen
1984 – 1993	Reichsstadt-Gymnasium Rothenburg ob der Tauber
Juli 1993	Allgemeine Hochschulreife
1993 – 1994	Zivildienst, Krankenhaus Rothenburg o.d.T.
WS 1994/95	Studium Betriebswirtschaftslehre, Universität Würzburg
SS 1995 – WS 2000/01	Studium Humanmedizin, Universität Würzburg
August 1998	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
SS 2001 – WS 2001/02	Studium Humanmedizin, Universität Kiel
August 2001	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
SS 2002 – WS 2002/03	Studium Humanmedizin, Universität Würzburg
November 2002	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Oktober 2001 – September 2002	Praktisches Jahr Anästhesie, Universitätsklinik Kiel Innere Medizin, Universitätsklinik Würzburg Chirurgie, Universitätsklinik Würzburg
Januar 2003 – März 2005	wissenschaftlicher Assistent bzw. Arzt im Praktikum, Medizinische Klinik und Poliklinik I der Universität Würzburg, Nephrologische Abteilung
Juli 2004	Approbation als Arzt
seit April 2005	wissenschaftlicher Assistent, Medizinische Klinik und Poliklinik I der Universität Würzburg, Kardiologische Abteilung

Würzburg im April 2005