

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. Lorenz

Eine *in-vitro*-Untersuchung des Einflusses von
Angiotensin II und Sulforaphan auf die Modulation
des oxidativen Stresses anhand der NFκB- und Nrf 2-
Aktivität in LLC-PK1 Zellen

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinische Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Arietta Lucia Lotz

aus Bonn, März 2023

1. Referentin: Prof. Dr. Helga Stopper

2. Referentin: Prof. Dr. Michaela Kuhn

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 22.03.2023

Die Promovendin ist Ärztin.

Für Tom

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Zusammenhang des arteriellen Hypertonus und der Karzinomprävalenz	1
1.2	Hormonelle Regulierung über das Renin/Angiotensin/Aldosteron-System	4
1.2.1	Wirkung von Angiotensin II auf die Nieren	6
1.3	Zellregulation und Zellreaktion auf oxidativen Stress	12
1.3.1	Reaktive Sauerstoffspezies und oxidative DNA-Veränderung	12
1.3.2	Einfluss der Zuckerkonzentration auf den oxidativen Stress	17
1.4	Einfluss der Transkriptionsfaktoren Nrf 2 und NF-κB	20
1.4.1	Struktur und Wirkmechanismus von Nrf 2	20
1.4.2	Struktur und Aufbau von NF-κB:.....	25
1.4.3	Vernetzungen zwischen Nrf 2 und NF-κB	26
1.5	Sulforaphan	29

1.5.1	Struktur, Eigenschaften und Vorkommen	29
1.5.2	Molekularer Wirkmechanismus	32
1.6	Zielsetzung der Arbeit	35
2	Material und Methoden	37
2.1	Chemikalien und Reagenzien	37
2.2	Material und Geräte	44
2.3	Zelllinie und Zellkultur	46
2.4	Puffer und Lösungen	52
2.5	Methoden	55
2.5.1	Comet Assay	55
2.5.2	Western Blot	60
2.5.3	Immunfärbung (Zellfärbung)	67
3	Ergebnisse	71
3.1	Nachweis DNA-Schaden durch Angiotensin II	71
3.2	Veränderung der Transkriptionsfaktoren Nrf 2 und NF- κ B in Abhängigkeit von der Dauer der Angiotensin II Exposition	77

3.3	Das anti-oxidative Potential von Sulforaphan	83
3.4	Der indirekte anti-oxidative Effekt über die Modulation des Transkriptionsfaktors Nrf 2	90
3.5	Die Modulation des Transkriptionsfaktors NF- κ B	95
3.6	Nachweis der Nrf 2 - induzierten Protein-expression.....	99
3.6.1	Veränderung der SOD-Konzentration ..	99
3.6.2	Veränderung der γ -GCSc-Konzentrationen	102
3.7	Zunahme des oxidativen Stresses bei hohen Zuckerkonzentrationen	105
3.8	Verhalten der Transkriptionsfaktoren bei hoher Glucosekonzentration	109
4	Diskussion	115
4.1	Angiotensin II, oxidativer Stress und induzierter DNA- Schaden	115
4.2	Angiotensin II, oxidativer Stress und der Einfluss auf die Transkriptionsfaktoren Nrf 2 und NF- κ B	122

4.2.1	Modulation des Transkriptionsfaktors NF-κB	122
4.2.2	Modulation des Transkriptionsfaktors Nrf 2	126
4.3	Oxidatives Potential von Sulforaphan.....	129
4.3.1	Nachweis der Modulation der Transkriptionsfaktoren Nrf 2 und NF-κB	132
4.3.2	Nachweis der Nrf 2-induzierten Proteinexpression	134
4.4	Zunahme des oxidativen Stresses bei hohen Zuckerkonzentrationen	137
5	Zusammenfassung	142
6	Literaturverzeichnis.....	145
	Appendix	
I	Abkürzungsverzeichnis.....	
II	Abbildungsverzeichnis	
III	Tabellenverzeichnis	
IV	Danksagung.....	
V	Curriculum Vitae	
VI	Eidesstattliche Erklärung	

1 Einleitung

1.1 Zusammenhang des arteriellen Hypertonus und der Karzinomprävalenz

Bluthochdruck ist eine der häufigsten Erkrankungen weltweit und machte bereits 2012 5% der globalen Erkrankungen aus. In Deutschland sind gemäß der Deutschen Hochdruckliga auf Boden der Datenanalyse des Robert- Koch Institut von Mai 2015 etwa 20 bis 30 Millionen Bundesbürger betroffen (Neuhauser, Kuhnert, & Born, 2017). Zusätzlich zeigte eine weitere 2017 veröffentlichte Studie, die sich mit der Entwicklung und Prävalenz des arteriellen Hypertonus von 1975 bis 2015 beschäftigte, nicht nur eine deutlich steigende Tendenz in Deutschland, sondern auch, dass der arterielle Hypertonus sich in den letzten Jahrzehnten von einer Wohlstandserkrankung der reicheren Länder zu einem Gesundheitsproblem der ärmeren Regionen gewandelt hat. Bezogen auf absoluten Zahlen wiesen 1975 noch schätzungsweise 594 Millionen Menschen einen Blutdruck von über 140/90mmHg auf, so waren es

im Jahr 2015 vermutlich bereits 1,13 Milliarden Menschen (Akl, Akik, Ghattas, & Obermeyer, 2017; Zhou et al., 2017; Zhou, Perel, Mensah, & Ezzati, 2021).

Aufgrund dieser Datenlage waren mehrere Anpassungen der Leitlinie zur Behandlung der arteriellen Hypertonie durch die europäischen Fachgesellschaften für Hypertonie (ESH) und Kardiologie (ESC) erforderlich (Whelton et al., 2018). Dabei gilt der arterielle Hypertonus als einer der wichtigsten kardiovaskulären Risikofaktoren, der nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation für 54 % der Schlaganfälle und 47 % der ischämischen Herzerkrankungen von zentraler Bedeutung für Morbidität und Mortalität ist (Lawes, Vander Hoorn, & Rodgers, 2008).

Dabei fiel in mehreren Metaanalysen eine erhöhte Krebsinzidenz als Komorbidität von Hypertension der Patienten auf. Bei der Betrachtung der Subgruppenanalysen zeigte sich dabei vor allem ein

erhöhtes Auftreten von Nierenzellkarzinomen (Stocks et al., 2012). Diese Daten wurden durch eine großangelegte internationale Kohortenstudie bestätigt. Hier zeigte sich nicht nur ein Zusammenhang zwischen arteriellem Hypertonus und Krebsinzidenz, sondern auch eine geschlechtsspezifische Differenzierung des Erkrankungsrisikos. Dabei ergaben Daten aus einer genomweiten Assoziationsstudie, dass das klarzellige Nierenzellkarzinom 2-mal häufiger bei Männern als bei Frauen auftritt. Dieser Unterschied stellte sich unabhängig von Altersgruppen, geografischer Lokalisation und Ethnien dar (Scelo et al., 2017). Hinsichtlich der Mortalität zeigten sich bei beiden Geschlechtern keine Unterschiede. Sie waren unabhängig des Geschlechtes signifikant um 2% erhöht (Corrao, Scotti, Bagnardi, & Sega, 2007). Erweitert und bestätigt wurden diese Daten durch die Ergebnisse einer Metanalyse von zehn weiteren Longitudinalstudien mit 47119 Teilnehmern (Grossman, Messerli, Boyko, & Goldbourt, 2002).

1.2 Hormonelle Regulierung über das Renin/Angiotensin/Aldosteron-System

Die Regulierung des Blutdrucks erfolgt maßgeblich durch zwei Systeme, das katecholaminergene System und das hormonelle System, das Renin/Angiotensin/Aldosteron-System (RAAS). Der Name des hormonellen Systems leitet sich von seinen Hauptakteuren dem Renin, dem Aldosteron und dem Angiotensin ab. Das Renin wird hauptsächlich von den juxtaglomerulären Zellen gebildet, gespeichert und sezerniert. Die juxtaglomerulären Zellen sind Epitheloidzellen in der afferenten Arteriole des Glomerulus, die β_1 -Adrenozeptoren besitzen und bei Stimulation vermehrt Renin freisetzen. Außerdem besitzen diese Zellen neben Adrenozeptoren auch Barorezeptoren, die auf verminderte Perfusion mit Renin-Sezernierung reagieren. Weitere Stimulatoren für eine Renin-Freisetzung sind unter anderem verminderte Natriumchlorid-Konzentrationen im distalen Tubulus und die Anwesenheit von Prostaglandinen. Renin selbst ist

ein Enzym, eine Protease, und kann nicht direkt auf das Gefäßsystem einwirken. Seine Aufgabe besteht darin, aus Angiotensinogen, welches ursprünglich aus der Leber stammt, Angiotensin I abzuspalten. Angiotensin I wird über ein Angiotensin-Conversions-Enzym, welches sich auf vielen Endothelzellen findet, in Angiotensin II gespalten. Dieses kann durch Aminopeptidasen zu Angiotensin III verändert werden. Beide wirken stark vasokonstriktorisch auf periphere und renale Arteriolen. Angiotensin II ist dabei potenter als Angiotensin III. Zudem stimulieren sowohl Angiotensin II und Angiotensin III die Aldosteron-Sekretion in der Nebennierenrinde aus den Glomerulosazellen (Aktories, 2009). Durch Aldosteron kommt es zu einer verminderten Natriumchlorid-Rückresorption, so dass das intravasale Blutvolumen steigt und gemäß der physikalischen Gesetzmäßigkeit, unter anderem der Hagen-Poiseuille-Gleichung, kommt es im Verlauf zu einer Blutdrucksteigerung.

1.2.1 Wirkung von Angiotensin II auf die Nieren

Neben dem systemisch wirksamen Angiotensin II konnte Angiotensin II auch lokal in Herz, Gehirn und Niere nachgewiesen werden (MacKenzie, Fraser, Connell, & Davies, 2002). An der Zelle wirkt Angiotensin II über vier Rezeptoren, unter denen vor allem AT1- und AT2-Rezeptoren führend scheinen (Kaschina & Unger, 2003). In der genaueren Betrachtung zeigt sich, dass der AT2-Rezeptor vor allem in der Fetalzeit exprimiert wird, seine Funktion ist noch nicht vollständig geklärt. Er scheint vor allem über eine Aktivierung der Serin/Threonin-Phosphatase, der MAP-Phosphatase und Inhibierung der MAP-Kinase sowohl eine pro-apoptotische als auch eine vasodilatatorische Funktion zu haben (Aktories, 2009). Der AT1-Rezeptor ist bereits besser untersucht. Er spielt im Herz/Kreislaufsystem eine wichtige Rolle und ist in vielen Geweben präsent. Physiologisch betrachtet ist der AT1-Rezeptor ein G-Protein-gekoppelter (Gq- und G12) Rezeptor, der über eine Signalkaskade mittels Aktivierung der

Phospholipase C und einem sekundären Messenger die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration steuert. Die Veränderung der Kalziumkonzentration führt einerseits zur Kontraktion der glatten Muskulatur, andererseits zur Aldosteron-Sezernierung aus den Zellen der Nebennierenrinde. Ein weiterer Mechanismus, der durch Aktivierung der Proteinkinase C entsteht, ist die Veränderung der Proteinphosphorylierung mit Hemmung der Adenylatcyclase, so dass es zu einer intrazellulären Reduktion des cyclischen Adenosinmonophosphats kommt, was wiederum zur Reduktion der Vasodilatation führt.

Ein weiterer Signalweg führt über die Aktivierung der Phospholipase A2, deren Wirkung zur Produktion von Arachidonsäure führt. Diese Arachidonsäure wird durch verschiedene Enzyme, darunter die Cyclooxygenasen, zur Synthese von Prostaglandinen genutzt, so dass es additiv auch zur einer lokalen Kontraktion kommt (Thomas & Messinger, 1993).

Auf Grundlage der Pathophysiologie erklärt sich die Rolle des Angiotensin II im Rahmen der Bluthochdruckerkrankung und bildet die Grundlage der medikamentösen Therapie, die bereits im klinischen Alltag und auch in den Leitlinien Einzug erhalten hat (Aktories, 2009; Susanne Brand, 2013). Dabei konnte bereits in verschiedenen Tiermodellen bewiesen werden, dass eine Behandlung mit ACE-Hemmern oder AT1-Rezeptorblockern neben einer Verbesserung der Blutdruckwerte, auch zu einer Verbesserung der Nierenfunktion beiträgt (Baboolal & Meyer, 1994).

Weitere Untersuchungen zeigen, dass sowohl die Konzentrationshöhe als auch die Expositionsdauer mit Angiotensin II eine Rolle spielen bei der Entwicklung einer renalen Fibrose (Border & Noble, 1998; Guo et al., 2001; Mezzano, Ruiz-Ortega, & Egido, 2001; Nina Queisser, Fazeli, & Schupp, 2010). Als Pathomechanismus wird angenommen, dass bei niedrigen Angiotensin II-Konzentrationen die Aktivierung der Phospholipase C und die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration

im Vordergrund steht, während bei hohen Angiotensin II-Konzentrationen die Entstehung des oxidativen Stresses und eine alternative Signalkaskade mittels Akt-Kinase und den Transkriptionsfaktoren Nrf 2 und NF- κ B postuliert wird, die letztendlich zu DNA-Schäden und Zelländerung führen kann (Bellezza, Mierla, & Minelli, 2010; Guo et al., 2001; S. J. Kang, You, & Kwak, 2011; Y.-M. Kang et al., 2009; W. Li et al., 2008; Naugler & Karin, 2008; Pueyo et al., 2000). Beispielsweise konnte bei Nierenzellen von Ratten nach Exposition mit erhöhten Angiotensin II-Konzentrationen eine vermehrte reaktive Sauerstoffspezies-Produktion mit Nachweis einer vermehrten Expression der NADPH+H⁺-Oxidase nachgewiesen werden (Zalba, José, Moreno, Fortuño, & Díez, 2005). Die NADPH+H⁺-Oxidase ist ein Transmembranprotein, das aus fünf Untereinheiten besteht, die sowohl katalytisch als auch regulatorisch wirken. Dabei wird G-Protein-abhängig die Untereinheit p47phox phosphoryliert, die so mit der Untereinheit p22phox interagieren

kann. Durch die Konformationsänderung kommt es zu einer Enzymaktivierung. Dabei wird Sauerstoff zu Superoxid oxidiert und ein Reduktionsäquivalent, in diesem Fall NADPH, reduziert zu $\text{NADPH} + \text{H}^+$ (Landmesser et al., 2002; Montezano & Touyz, 2012). Durch die Gabe eines Angiotensin II Rezeptor-Antagonisten und damit einer geringeren Wirkung von Angiotensin II auf die Zelle, konnte passend zu den Hypothesen eine Suppression der NADPH-Oxidase gezeigt werden. Im Umkehrschluss würde dies bedeuten, dass durch die Exposition mit erhöhten Angiotensin II-Konzentrationen auch konsekutiv die Expression der NADPH-Oxidase erhöht sein müsste. Dieser Zusammenhang konnte ebenfalls bereits belegt werden (Brandt, 2014; Zalba et al., 2005). Zur Vereinfachung sind die für diese Arbeit wichtigen intrazellulären Signalkaskaden in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

Einleitung

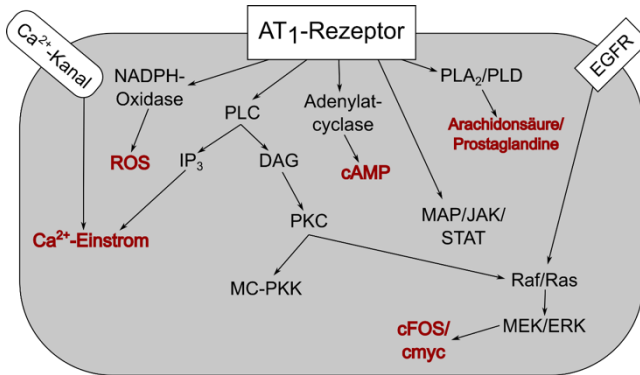


Abbildung 1: Schematische Darstellung der intrazellulären Signaltransduktion nach Aktivierung des AT₁-Rezeptors. Rot dargestellt in dieser Arbeit wichtige Zwischen- und Endprodukte. Modifiziert nach (Siragy, 2004).

1.3 Zellregulation und Zellreaktion auf oxidativen Stress

1.3.1 Reaktive Sauerstoffspezies und oxidative DNA-Veränderung

Die Forschung über oxidativen Stress ist ein relativ neues Forschungsgebiet, das lange Zeit unbeachtet blieb (Gerschman, 1981). In den 50er Jahren gab es einige Experimente, die nachwiesen, dass durch Röntgenstrahlung freie Radikale entstehen, die toxische Effekte auf den Organismus haben (R. Gerschman, Gilbert, Nye, & Fenn, 1954). An Bedeutung gewann das Forschungsgebiet erst in den 1970ern. Dort zeigte sich in mehreren Experimenten, dass oxidativer Stress nicht nur exogen, sondern ebenso endogen durch Reaktionsprodukte des Metabolismus induziert werden kann (McCord & Fridovich, 1968; McCord, Keele, & Fridovich, 1971).

Mit dem Begriff „oxidativer Stress“ wird das Missverhältnis zwischen den Oxidations- und Reduktionspartnern bezeichnet. Dieses Reduktions-/Oxidationssystem ist eine wichtige

Grundlage unseres Organismus. Es spielt beispielsweise eine essenzielle Rolle in der Atmungskette der Mitochondrien, bei der Phosphorylierung von Proteinen, bei biosynthetischen Prozessen der Schilddrüse und bei der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (Brieger, 2012).

Eine weitere wichtige Rolle haben freie Radikale bei der Abwehr von Krankheitserregern und bei der Signalübertragung der Synapsen im Gehirn. Chemisch betrachtet, zeichnen sich solche Substanzen dadurch aus, dass sie ungepaarte Elektronen in der Valenzschale oder instabile Verbindungen enthalten, wodurch sie die Eigenschaft besitzen, besonders reaktionsfreudig zu sein. Am Beginn der Reaktionskette findet dabei meist ein Ein-Elektronen-Transfer auf ein Sauerstoffmolekül statt, was zu der Namensgebung reaktive Sauerstoffspezies (ROS) führte (Franco, 2008). Zu dieser Gruppe gehört eine Vielzahl an Molekülen, wobei nur die, für diese Arbeit wichtigen, im Verlauf erwähnt und vorgestellt werden.

Zudem zeigte sich ein Zusammenhang der Überproduktion von reaktiven Sauerstoffspezies in den Zellen und der Entstehung von verschiedenen kardiovaskulären/neurodegenerativen Erkrankungen (Calabrese et al., 2007; Shah & Channon, 2004). Dabei entstehen im Rahmen von inflammatorischen Prozessen reaktive Sauerstoffspezies bei der Biosynthese von Prostaglandinen und Leukotrienen in aktivierten Leukozyten. Zudem kann es begünstigt durch die ROS zur Synthese weiterer Entzündungsmediatoren wie IL-6, TNF- α oder inflammatorischer Enzyme kommen. Der pathophysiologische Mechanismus ist dabei die Reaktion der reaktiven Sauerstoffspezies mit Proteinen, Lipiden, Kohlenhydraten und der DNA.

Dabei präsentiert sich die DNA-Veränderung vielseitig: als Doppel- oder Einzelstrangbruch, DNA-Protein-Crosslink, Basenmodifikation und abasische Stelle (Breimer, 1990). Im Vordergrund steht dabei die oxidative Reaktion, bei welcher es zur Bildung der Basenmodifikationen 8-Oxo-7,8-

dihydro-2'-desoxyguanosin (8-oxo-dG) und *8-Oxodihydroguanin (8-oxo-Gua)* kommt, was bei Zellteilung zu einer Transversion von Guanin zu Thymin führen kann (Mandel, 2015). Ebenso spielt die Methylierungsmodifikation des benachbarten Cytosins eine Rolle, wodurch im Verlauf keine Bindung der Methyltransferasen stattfinden kann, so dass ein DNA Lesefehler entsteht, der sowohl diese Base als auch die Nachbarbase betrifft (Breimer, 1990). Weiterhin wird die Auswirkung auf die Epigenetik diskutiert, die sich durch die Veränderung der DNA-Methylierung mit konsekutiver Histonmodifikation ergibt. Potentiell werden Tumorsuppressorgene nicht mehr abgelesen und zum anderen werden Protoonkogene zu Onkogenen aktiviert (Franco, Schoneveld, Georgakilas, & Panayiotidis, 2008; Ziech, Franco, Pappa, & Panayiotidis, 2011).

Als Reaktion auf die Überproduktion von reaktiven Sauerstoffspezies hat der Organismus die Möglichkeit, über verschiedene Reparaturmechanismen die DNA direkt

wiederherzustellen oder die reaktiven Sauerstoffspezies vor der Schädigung über antioxidative Enzyme abzubauen. Zu diesen antioxidativen Enzymen zählen unter anderem die Superoxiddismutase und die Hämoxigenase-1. Ihre Expression wird hauptsächlich über den Transkriptionsfaktor Nrf 2 (nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) reguliert (Hybertson, Gao, Bose, & McCord, 2011).

Zur Detektion der oxidativen DNA-Schädigung in Zellen werden unterschiedliche Messmethoden beschrieben. Dabei gibt es neben immunchemische Methoden auch chromatographischen Möglichkeiten, die beispielsweise zur Messung von 8-oxo-(d)G im Urin oder in peripheren Zellen (Lymphozyten) genutzt werden. Eine weitere häufig eingesetzte Methode besteht in der Einzelzellgelelektrophorese (Comet Assay) (Sonnenlicht, 2008).

1.3.2 Einfluss der Zuckerkonzentration auf den oxidativen Stress

Weltweit steigt die Zahl der Hypertonie-Erkrankten und die globale Inzidenz von Hypertonie unter Erwachsenen wird sich Schätzungen zufolge bis zum Jahre 2025 um 60% erhöhen (Kearney et al., 2005). Dabei ist der arterielle Hypertonus häufig mit Komorbiditäten vergesellschaftet. Als häufigste Komorbidität zeigte sich dabei die abdominelle Adipositas, eine Fettstoffwechselstörung mit Hyperglyceridämie, erniedrigtem HDL-Cholesterin und einem Diabetes mellitus Typ II (Stocks et al., 2012). Diese Kombination wird als metabolisches Syndrom bezeichnet.

Bei Analysen von Heidemann, Du und Scheidt-Nave, stellte sich ein Unterschied zwischen Patienten mit Typ-1- und Typ-2-Diabetes heraus. Während beim Typ-1-Diabetes eine Hypertonie in der Regel erst im Verlauf mit zunehmender Dauer der Erkrankung auftrat, bestand bei Typ-2-Diabetes meist bereits bei der Erstdiagnose ein arterieller Hypertonus. Nach längerer Erkrankungsdauer ließ

sich eine Prävalenz des arteriellen Hypertonus zwischen 80-90 % nachweisen (Heidemann, Du, & Scheidt-Nave, 2011; Parving et al., 1988; Schmieder & Bretzel, 2015). Außerdem präsentierte sich in mehreren retrospektiven Studien eine Korrelation zwischen dem Nachweis eines erhöhten Zuckerspiegels im Blut (Diabetes mellitus) und dem Auftritt von Nierenkarzinomen (Lindblad et al., 1999). Dieser Zusammenhang wurde in einer Metaanalyse einer großen internationalen Kohortenstudie aus Europa, Nordamerika und Asien genauer untersucht, in der sich eine positive Korrelation bestätigte. Ein direkter kausaler Zusammenhang konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Larsson & Wolk, 2011).

Bei der Untersuchung in mesangialen Zellen von Mäusen zeigte sich mit steigender Zuckerkonzentration eine Aktivierung der Proteinkinase C und es konnten erhöhte Konzentrationen von ROS als Zeichen eines erhöhten oxidativen Stress nachgewiesen werden (Ha, Yu, Choi, Kitamura, & Lee, 2002; Xu, Zhu, &

Zhu, 2014). Durch den erhöhten oxidativen Stress kam es zu einer vermehrten Nrf 2-Aktivierung, wodurch die Expression antioxidativ wirkender Proteine, vor allem von HO-1 und γ -GCSc, stimuliert wurden (Li et al., 2011). Als weiterer Pathomechanismus wird eine Hyperinsulinämie angesehen, die zu einer Überstimulation am IGF-Rezeptor und somit potentiell zu einem unkontrollierten Zellwachstum führt (Stern & Haffner, 1986).

1.4 Einfluss der Transkriptionsfaktoren Nrf 2 und NF- κ B

1.4.1 Struktur und Wirkmechanismus von Nrf 2

Der Nuclear factor erythroid 2- related factor 2 (Nrf 2) ist ein Mitglied der cap'n'collar Familie der Leucin-Zipper-Transkriptionsfaktoren. Insgesamt besteht die Familie aus sechs Mitgliedern: NF-F2, Nrf 1, Nrf 2, Nrf 3, Bach1 und Bach2. Trotz ihrer chemisch ähnlichen Struktur haben sie biologisch betrachtet verschieden Aufgaben. NF-F2 ist Erythroid-spezifisch und ein Fehlen des Proteins führt zu einer Anämie und schweren Blutungen. Nrf 1 kommt ubiquitär vor. Kommt es zu einem Defekt des Proteins, entstehen schwere embryonale Schäden. Nrf 2 ist ebenfalls in allen Geweben vorhanden und spielt im Redoxsystem eine Schlüsselrolle. Nrf 3 lässt sich vor allem in der Plazenta nachweisen. Seine Funktion ist bisher nicht ausreichend geklärt (D. D. Zhang, 2006). Betrachtet man Nrf 2 genauer, so wird seine Aktivität über das Kelch-like ECH associate protein 1 (KEAP 1) gesteuert. Dabei ist der Hauptregulator

das KEAP 1-Protein, über welches der Abbau von Nrf 2 mittels Proteasen reguliert wird. Dabei wird mit dem Adaptorprotein Cul3-based E3 ein Ubiquitinligase- Komplex gebildet (McMahon, Itoh, Yamamoto, & Hayes, 2003). KEAP1 selbst ist dabei redoxabhängig und besitzt 27 oxidierbare Cysteinketten. Werden diese oxidiert, kommt es zur Dissoziation des Nrf 2/KEAP1-Komplexes und zur Aktivierung von Nrf 2.

Das Protein Nrf 2 selbst besitzt sechs Domänen Neh 1-6 mit unterschiedlichen Funktionen. Die Neh 1-Domäne besitzt den CNC-Typ Leucin Zipper, der zur DNA-Bindung und Dimerisierung mit anderen Transkriptionsfaktoren notwendig ist. An der Neh 2-Domäne findet nicht nur der über die Lysinketten der Proteasen gesteuerte Abbau statt (Ubiquitinierung), sondern auch die Bindung an KEAP 1 (Kelch Region).

Die Neh 3 -Domäne spielt eine Rolle bei der Aktivierung von Nrf 2 über die Bindung von Koaktivatoren, unter anderem CHD6, deren genaue

Funktion noch unklar ist (da Costa et al., 2019; Kobayashi & Yamamoto, 2005; Surh & Na, 2008). Die weiteren drei Domänen sind für diese Arbeit nicht relevant und werden deswegen nicht weiter besprochen.

Unter physiologischen Umständen liegt Nrf 2 inaktiv in einem Komplex mit KEAP1 vor. Durch Veränderung des oxidativen Potentials, sei es direkt durch oxidativen Stress oder indirekt durch eine Signalkaskade und Second Messenger, kommt es zur redoxabhängigen Thiolmodifizierung des KEAP1 und konsekutiv zur Dissoziation des Nrf 2/KEAP1-Komplexes. Dies führt zur vermehrten Translokation des freien Nrf 2 in den Nucleus. Dort bindet Nrf 2 sich über ein zusätzliches Protein (MAF) an eine Gensequenz, die „antioxidant response element“ (ARE) genannt wird, und es kommt zur vermehrten Expression der ARE-kontrollierten Proteine (D. D. Zhang, 2006). Somit ist Nrf 2 eine wichtige Regulationseinheit der Zelle zur Wiederherstellung der Redox-Homöostase bei oxidativem Stress und spielt bei Entstehung von

Tumoren eine entscheidende Rolle, wodurch es als Ziel bei der Entwicklung von Chemotherapeutika immer mehr in den Vordergrund rückt (S. Brand, Amann, & Schupp, 2013; D. D. Zhang, 2006). Zur Vereinfachung ist in

Abbildung 2 eine schematische Zusammenfassung der Funktion der Transkriptionsfaktoren Nrf 2 und NF- κ B dargestellt. So konnte bereits beobachtet werden, dass es unter künstlichen Bedingungen bei Tumorzellen mit einer mutationsbedingten Fehlfunktion des KEAP1-Proteins und damit einem erhöhten Nrf 2-Gehalt in der Zelle zur Entwicklung einer Chemoresistenz kommt (Wang et al., 2008).

Einleitung

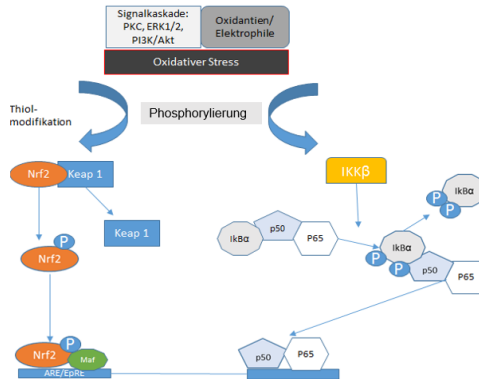


Abbildung 2: Stark vereinfachte Darstellung der Funktion der Transkriptionsfaktoren Nrf 2 und NF-κB in der Zelle bei oxidativem Stress. Genaue Beschreibung folgt im Text. Modifiziert nach Young-Joon Surh und Hye-Kyung Na (Surh & Na, 2008).

1.4.2 Struktur und Aufbau von NF- κ B:

Der Nuclear Factor- κ B reguliert zahlreiche zelluläre Prozesse, unter anderem die Inflammation, die Immunität, die Zellproliferation und die Apoptose. Er besteht aus fünf Untereinheiten NF- κ B1 (p50 bzw. p105), NF- κ B2 (p52 bzw. p100), RelA (p65), RelB und c-Rel. Alle Untereinheiten besitzen eine Rel-Homologie-Domäne, die etwa 300 Aminosäuren enthält. Jeweils zwei Untereinheiten können untereinander Dimere bilden. Obwohl mathematisch viele Dimerkombinationen möglich sind, konnten vor allem Heterodimere aus einem Nicht-Rel-Protein (NF- κ B1 oder NF- κ B2) und einem Rel-Protein nachgewiesen werden. Die Rel-Proteine besitzen im Gegensatz zu den Nicht-Rel-Proteinen mindestens eine Transaktivierungsdomäne, die zur Aktivierung der Gentranskription führt (Karin & Ben-Neriah, 2000).

Unter physiologischen Bedingungen liegt NF- κ B gebunden an spezifische Inhibitoren (I κ B) inaktiv im Zytoplasma vor. Eine Zellstimulation führt über eine Signalkaskade zur Phosphorylierung der Inhibitoren

(I κ B-Proteine) mittels Kinasen. Als mögliche Stimulanzen dienen Zytokine, UV-Strahlung, ionisierte Radikale, genotoxische Substanzen und oxidativer Stress. Diese Phosphorylierung führt zur Ausbildung von Ubiquitin-Ligase-Komplexen und es erfolgt ein rascher Abbau der Inhibitoren. Durch den Wegfall der Inhibitoren wird NF- κ B freigesetzt und es kommt zur Translokation in den Zellkern. Dort bindet es an einen Promotor oder an eine Enhancer-Region, so dass zahlreiche Gene abgelesen werden (Gloire, Legrand-Poels, & Piette, 2006; Karin & Ben-Neriah, 2000).

1.4.3 Vernetzungen zwischen Nrf 2 und NF- κ B

Zudem ergaben sich in mehreren *in vitro*-Untersuchungen Hinweise, dass die Transkriptionsfaktoren Nrf 2 und NF- κ B nicht nur einzeln eine Schlüsselrolle spielen, sondern auch miteinander interagieren können im Rahmen eines negativen Feedback-Mechanismus (Feedback-Inhibition). Dabei besteht keine direkte Interaktion zwischen Nrf 2 und NF- κ B, vielmehr geht man aktuell davon aus, dass sie sich indirekt inhibieren

(Bellezza et al., 2010). Als ein möglicher Mechanismus wird die Verbindung über die Hämoxygenase (HO) angenommen, welche zu den anti-oxidativ wirkenden Enzymen gehört und im menschlichen Körper in Form von zwei Isoenzymen, HO-1 und HO-2, vorkommt. HO-1 spielt eine wichtige Rolle beim Abbau des Häm. Dieser erfolgt in mehreren Schritten, bei dem aus einem Protoporphyrin IX-Ring in äquimolare Mengen Kohlenstoffmonoxid (CO), Fe²⁺-Komplex, welches zu Ferritin wird, und Biliverdin entstehen. Biliverdin wiederum kann durch die Biliverdinreduktase in Bilirubin umgewandelt werden. Durch diese komplexe Redoxreaktion wird der oxidative Stress reduziert, so dass HO-1 durch seine Funktion einen antioxidativen Effekt besitzt (Abraham et al., 2003; Cheng & Rong, 2017; Datla et al., 2007; Li et al., 2011; M. Li et al., 2008; Taillé et al., 2004). Bei einer *in vitro*-Untersuchungen ließ sich bei einer erhöhten Aktivität von Nrf 2 neben einer vermehrten Expression des Enzyms HO-1 gleichzeitig eine gehemmte Freisetzung von NF-κB nachweisen. Im

Einleitung

Umkehrschluss führte ein hohes Level an NF- κ B mittels der Untereinheit p65 zu einer Inhibierung der Genexpression der Nrf 2/ARE-Domäne mit anschließend reduziertem Nrf 2-Nachweis, weshalb eine gegenseitige Modulation der Transkriptionsfaktoren postuliert wurde (Bellezza et al., 2010), siehe Abbildung 3.

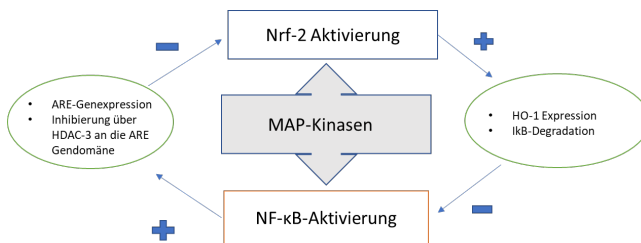


Abbildung 3: Schematische Darstellung möglicher Vernetzung (Feedbackmechanismus) von Nrf 2 und NF- κ B. Angelehnt an die in Cancers 2010 publizierte Graphik (Bellezza et al., 2010)

1.5 Sulforaphan

1.5.1 Struktur, Eigenschaften und Vorkommen

Eine inhibitorische und protektive Wirkung von Isothiocyanaten konnte bei bestimmten Tumoren demonstriert werden (Chiao et al., 2002; Singh, Xiao, Lew, Dhir, & Singh, 2004; Traka, Melchini, & Mithen, 2014). Die Isothiocyanate (ITC) kommen natürlich in Pflanzen vor. Sie gehören zu den Glucosinolaten, die sich chemisch im Aufbau durch ein Aryl-, Alkyl-, Alkenyl- oder Indolstruktur unterscheiden. Dabei sind die Thioglycoside Ausgangsstoffe für die Isothiocyanate (ITC), die als funktionelle (Thiol)-Gruppe $N=C=S$ haben. Die Isothiocyanate werden wiederum unterteilt in die Gruppen der Allylisothiocyanate (AITC), der Benzylisothiocyanate (BITC), der Phenethylisothiocyanate (PITC) und schließlich in Sulforaphan, welches aus dem Vorläufer Glucoraphanin entsteht, schematisch dargestellt in Abbildung 4.

Isothiocyanate (ITC) kommen vor allem in der Pflanzenfamilie der Kreuzblütler (*Brassicaceae*

oder *Cruciferae*) vor (Ackermann, 2013; Matusheski & Jeffery, 2001; K. Zhang, Cho, Posner, Talalay,, 1994). Dort liegen die Glucosinolate intrazellulär mit dem Enzym Myrosinase (β -Thioglucosidase) vor, wobei beide in verschiedenen Zellkompartimenten lokalisiert sind. Bei der Destruktion dieser Kompartimente durch Infektionen oder mechanische Zerstörung reagieren die Glucosinolate mit der Myrosinase. Es kommt zur Hydrolyse, wodurch Glukose freigesetzt wird und instabile Aglykone entstehen. Diese können einige bioaktive Verbindungen wie Isothiocyanate, wie Sulforaphan, Thiocyanate und Nitrile bilden. Dabei beruht die biologische Aktivität auf den Hydrolyseprodukten der Myrosinase, da Glucosinolate selbst nicht bioaktiv sind (Dinkova-Kostova & Kostov, 2012).

Einleitung

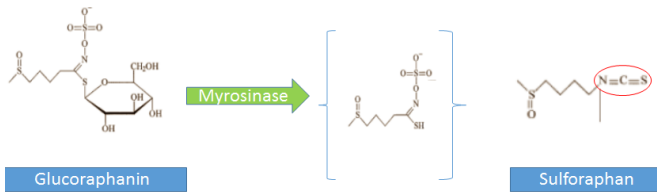


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Umwandlung von Glucoraphanin durch Hydrolyse in Sulforaphan. Rot gekennzeichnet die funktionelle Gruppe der Isothiocyanate.

Sulforaphan findet man in hohen Dosen (0,8-21,7 $\mu\text{mol/g}$) in Brokkoli und vor allem in den Brokkolisprossen (Y. Zhang, Li, & Tang, 2005). Der Mensch besitzt keine Myrosinase. Das bedeutet, er ist auf die bakterielle Darmflora angewiesen, damit sie die Glucosinolate zu Isothiocyanaten aktiviert. Dabei werden nur etwa 20% der Glucosinolate zu Sulforaphan umgewandelt. Die Plasmakonzentrationen können nach dem Verzehr von einer Portion Brokkoli zwischen 1 μM und 2,25 μM betragen (Al Janobi et al., 2006; Gasper et al., 2005). Dabei zeigte sich bei einer Analyse, dass die Aufnahme an Glucosinolaten in der europäischen Bevölkerung zwischen 4,7 und 65 mg am Tag schwankt (Steinbrecher & Linseisen, 2009).

1.5.2 Molekularer Wirkmechanismus

Als zellulärer Mechanismus reguliert Sulforaphan die Expression von Zytochrom P450 und damit die Induktion von Phase I-Enzymen, die eine wichtige Rolle bei der Bioaktivierung von chemischen Karzinogenen spielt (Haouzi et al., 2000; Mahéo et al., 1997). Mittlerweile zeigte sich in Tierversuchen, dass nicht alle Untergruppen des Zytochrom P450 betroffen sind. Auf die Untergruppe CYP1A2 z.B. scheint Sulforaphan keinen Effekt zu haben (Chipman, 1996).

Des Weiteren sind auch die Phase II-Enzyme betroffen, die notwendig sind zur Detoxifizierung und damit zum Schutz der Zellen gegenüber exogenen oder endogenen Noxen (Yoxall et al., 2005). Hier konnte bei *in vivo*-Untersuchungen eine vermehrte Expression der Glutathion S Transferase (GST), der NAD(P)H- Dehydrogenase (NQO1) und der γ -Glutamylcysteinsynthase (γ -GSC) nachgewiesen werden (Brooks, Paton, & Vidanes, 2001; Mahéo et al., 1997; Matusheski & Jeffery, 2001). Auch die Einleitung der Apoptose scheint

Sulforaphan zu beeinflussen. Dabei zeigte sich bei *in vitro*- als auch *in vivo*-Untersuchungen eine Beeinflussung des Caspasen-abhängigen und des Caspasen-unabhängigen Weges (Karmakar, Weinberg, Banik, Patel, & Ray, 2006; Singh et al., 2004). Ebenso wurden epigenetische Modifikationen beobachtet durch Hemmung der Histon-Deacetylase (Myzak, Dashwood, Orner, Ho, & Dashwood, 2006; Myzak, Karplus, Chung, & Dashwood, 2004). Die Fähigkeit von Sulforaphan, die Apoptose einzuleiten und somit die Rate der Proliferation zu senken, führt nicht nur zur Verhinderung der Tumorprogression, sondern auch zur Hemmung der Angiogenese, die ein wichtiger Schritt bei der Metastasierung darstellt (Bertl, Bartsch, & Gerhäuser, 2006; Thejass & Kuttan, 2006). So konnte in einer Studie bei Lungenadenomen eine niedrige Konversionsrate zum Karzinom nachgewiesen werden, wenn Sulforaphan verabreicht wurde (Conaway et al., 2005). Ebenso ergab sich bereits in mehreren Zelllinien der Hinweis, dass Sulforaphan ein

potenter Nrf 2 Aktivator ist, wodurch es zur Wiederherstellung der Redox-Homöostase bei oxidativem Stress kommt (Bai et al., 2015; Cui et al., 2012). Dieser Effekt zeigte sich auch bei weiteren Tumoren verschiedener Zelllinien. Die genauen molekulare Mechanismen (Abbildung 5) sind Gegenstand aktueller Forschung.

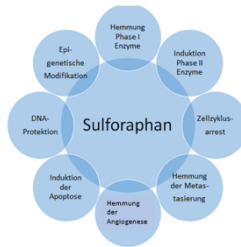


Abbildung 5: Zusammenfassung der bisher erforschten molekularen Wirkmechanismen von Sulforaphan.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es zunächst, an diesem Zellmodell nachzuweisen, dass Angiotensin II zu DNA-Schäden und somit zu genomischer Instabilität führt. Anschließend wird der oxidative Stress und die Modulation *in-vitro* genauer betrachtet und vor allem der Einfluss der Konzentrationshöhe und Expositionsdauer von Angiotensin II auf die Zelle selbst und auf die DNA-Veränderung untersucht. Weiterhin wird erforscht, welche Auswirkung das veränderte oxidative Potential der Zelle auf die Transkriptionsfaktoren Nrf 2 und NF- κ B und folglich auf die Expression antioxidativer Enzyme hat.

Ein weiteres Ziel ist es, *in-vitro* den anti-oxidativen und DNA-protektiven Effekt von Sulforaphan in den Nierenzellen nachzuweisen mit besonderer Untersuchung der Abhängigkeit der anti-oxidativen Funktion des Sulforaphan von der Dauer der Stressexposition. Dabei wird der anti-oxidative Effekt auf ihre direkte und indirekte Wirkung in

Hinblick auf die Modulation der Transkriptionsfaktoren Nrf 2 und NF- κ B betrachtet.

Zuletzt wird die Auswirkung erhöhter Glucosekonzentrationen auf das oxidative Potential und die DNA-Veränderung bei Nierenzellen analysiert.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Sämtliche Chemikalien (analytischer Reinheitsgrad; p.A.) wurden, falls nicht anders vermerkt, von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe), Serva Electrophoresis (Heidelberg), Merck Eurolab (Darmstadt) sowie SigmaAldrich (St. Louis) bezogen. Das in den Versuchen benutzte Angiotensin II entstammt der Firma Ray Biocross (Norcross, USA). Die genauen Angaben zu den einzelnen Chemikalien sind in der Tabelle 1 aufgelistet. Sulforaphan wurde von der Firma SigmaAldrich (St. Louis, USA) benutzt. Die in den Versuchen verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2 aufgeführt. Zusätzlich verwendete Materialien wie Puffer, Gele, und Lösungen sind den passenden Methoden zugeordnet. In Tabelle 3 sind die verwendeten Materialien beziehungsweise Geräte, deren Verwendungszweck und Hersteller aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Hersteller

CHEMIKALIE	HERSTELLE R
ALKALISCHE PHOSPHATASE	Roche (Basel, CH)
AMEISENSÄURE	Roth (Karlsruhe, D)
ANGIOTENSIN II	Ray Bio (Norcross, USA)
AMMONIUMFORMIAT	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
AMMONIUMPERSULFAT (APS)	AppliChem (Darmstadt, D)
BRADFORD REAGENZ	Bio-Rad (München, D)
CONFOCAL-MATRIX®	Micro Tech Lab (Graz, A)
DIMETHYLSULFOXID (DMSO)	Roth (Karlsruhe, D)
4',6-DIAMIDIN-2-PHENYLINDOL (DAPI)	Sigma (München, D)
1,4-DIAZABICYCLO [2.2.2] OCTAN (DABCO)	Sigma (München, D)
2-[4-(2-HYDROXYETHYL) PIPERAZINYL]	Roth (Karlsruhe, D)
ETHANSULFONSÄURE (HEPES)	
DIMETHYLSULFOXID (DMSO)	Roth (Karlsruhe, D)
DIKALIUMHYDROGENPHOSPHAT	Roth (Karlsruhe, D)
DINATRIUMHYDROGENPHOSPHAT	Roth (Karlsruhe, D)

Material und Methoden

ETHYLENDIAMINTETRAESSIGSÄURE (EDTA)	Roth (Karlsruhe, D)
ETHANOL	Sigma (München, D)
FETALES KÄLBERSERUM (FBS)	Merck Millipore (Darmstadt, D)
GELRED®	Biotium (Hayward, USA)
HIGH MELTING POINT (HMP) - AGAROSE	Roth (Karlsruhe, D)
ISOPROPANOL	Roth (Karlsruhe, D)
KATALASE	Roche (Basel, CH)
RINDERSERUMALBUMIN (BSA)	PAA (Pasching, A)
KALIUMCHLORID	Sigma (München, D)
KALIUMDIHYDROGENPHOSPHAT	Roth (Karlsruhe, D)
KALIUMHYDROXID	Sigma (München, D)
KONFOKALE MATRIX	Micro Tech Lab (Graz, A)
KUPFERSULFAT	Sigma (München, D)
L-GLUTAMIN	PAA (Pasching, A)
LITHIUMACTETAT-2-HYDRAT	Sigma (München, D)
LOW MELTING POINT (LMP)- AGAROSE	Sigma (München, D)
LUMINOL	ThermoScientific (Rockfurt, USA)

MAGNESIUMCHLORID	Sigma (München, D)
METHANOL (HPLC GRADE)	Roth (Karlsruhe, D)
METHYLENBLAU	Sigma (München, D)
NATRIUMACETAT	Roth (Karlsruhe, D)
NATRIUMCHLORID	Roth (Karlsruhe, D)
NATRIUMHYDROXID	Roth (Karlsruhe, D)
NATRIUMIODID	AppliChem (Darmstadt, D)
NATRIUMLAURYL-SULFAT (SDS)	Roth (Karlsruhe, D)
NUKLEASE P1	Sigma (München, D)
PAGE RULER (MARKER WESTERN BLOT)	Thermo Scientific (Rockford, USA)
PENICILLIN/STREPTOMYCIN	PAA (Pasching, A)
PROTEINKINASE K	Roth (Karlsruhe, D)
PROTEASE-INHIBITOR-COCKTAIL PHOSPHATASEINHIBITOR	Thermo Scientific (Rockford, USA)
PONCEAU S (3-HYDROXY-4-((2-SULFO-4-((4-SULFOPHENYL) AZO) PHENYL) AZO) -2,7-NAPHTHALINDISULFONSÄURE)	Roth (Karlsruhe, D)

POLYACRYLAMID	AppliChem (Darmstadt, D)
ROTI® LOAD 1	Roth (Karlsruhe, D)
SULFORAPHAN	SigmaAldrich (St. Louis, USA)
SALZSÄURE	Roth (Karlsruhe, D)
TRIS(HYDROXYMETHYL)- AMINOMETHAN (TRIS)	Roth (Karlsruhe, D)
TRITON® X-100	Sigma (München, D)
TRYPSIN	PAA (Pasching, A)
TEMED	Roth
TETRAMETHYLETHYLENEDIAMI NE	(Karlsruhe, D)
TWEEN (POLYSORBAT 20)	Sigma (München, D)
WASSER (HPLC GRADE)	Roth (Karlsruhe, D)
WASSERSTOFFPEROXID (H₂O₂)	Sigma (München, D)
ZIEGENSERUM	DAKO (Hamburg, D)

Tabelle 2: Antikörper mit den zugehörigen Epitopen, Verwendungen und Herstellern

Antikörper	Epitop, Hersteller	Verwendung,
Anti-	Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen eine Peptid-Kartierung am N-terminus des	

Material und Methoden

NF-κB p65 (A): sc-109	NF- κ B p65 Proteins humanen Ursprungs, 1:50 bis 1:500 für Immunfärbung, 1:200 bis 1:1000 für Western Blot, Santa Cruz (Heidelberg, D)
Anti-Kaninchen	Polyklonaler Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen-IgG, Cy3- gekoppelt, sekundärer Antikörper für Immunfluoreszenz (1: 400), Jackson Immunosearch (Newmarket, GB)
Anti-Nrf 2 (C-20): sc-722	Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen eine Peptid-Kartierung am C-Terminus der Nrf 2 Proteins menschlichen Ursprungs, 1:50 bis 1:500 für Immunfärbung, 1:200 bis 1:1000 für Western Blot, hier verwendet 1: 500; Santa Cruz (Heidelberg, D)
Anti-Kaninchen	Polyklonaler Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen-IgG, HRP*-konjugiert, sekundärer Antikörper für Western Blot (1: 1000-3000), Cell Signaling Technology (Denvers, USA)
Anti-Heme Oxygenase 1 (HO-1)	Monoklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen ein synthetisches Peptid am N-Terminus des HO-1 humanen Ursprungs, 1:100 bis 1:250 für Immunfloreszenz, 1:1000 bis 1:10000 für Western Blot, Epitomics/Abcam (Burlingame; California/USA)

Material und Methoden

<p>Anti-Glutamylcystein Synthetase schwere Untereinheit/ γ-GCSc (H-338): sc-22755</p>	<p>γ-Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen die Aminosäuren 338-637 des humanen γ-GCSc, 1:50 bis 1:500 für Immunfärbung, 1:100 bis 1:1000 für Western Blot, Santa Cruz (Heidelberg, D), hier verwendet 1:500</p>
<p>Anti-α-Tubulin</p>	<p>Monoklonaler Antikörper aus einer Maus gegen Epitope am C-terminus von der α-Tubulin Isoform verschiedener Organismen. 1:500 für Immunfloreszenz und für Western Blot, SigmaAldrich (St. Louis, USA)</p>
<p>Anti-Maus</p>	<p>Polyklonaler Antikörper aus Ziege gegen Maus-IgG, HRP*-konjugiert, sekundärer Antikörper für Western Blot (1:2000-10000), Santa Cruz (Heidelberg, D)</p>
<p>Anti-γH2A.X</p>	<p>Monoklonaler Antikörper aus einer Maus gegen Epitope des phosphoryliert menschlichen Histon H2A.X. (Serin 139);1:500 für Immunfloureszenz, 1μg/ml für den Western Blot, Epitomics/Abcam (Burlingame; California/USA)</p>
<p>Anti-Superoxide Dismutase (SOD1): 1926-1</p>	<p>Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen Peptid-Kartierung am N-terminus des humanen SOD1, 1:5000 für Western Blot, hier verwendet</p>

Material und Methoden

1:1000; 1:50 – 1:100 für
Immunfärbung,
Epitomics/Abcam (Burlingame;
California/USA)

*HRP: Meerrettich-Peroxidase.

2.2 Material und Geräte

Tabelle 3: Material beziehungsweise Geräte, deren Verwendungszweck und Hersteller

Material/Geräte	Verwendungszweck	Hersteller
6 Well-Zellkulturplatte	Zellkultur	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Zellkulturflaschen (175 und 75 cm²)	Zellkultur	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Zellkulturschaber	Zellkultur	TPP (Trasadingen, CH)
Deckgläser (24x24mm) Deckglas rund Ø 40mm	Comet Assay/ Zellfärbung	Hartenstein (Würzburg, D) Marienfeld (Lauda, D)
Eppendorf Cup	Proteinisolierung/ western Blot	Eppendorf (Hamburg, D)
Objektträger Super Frost (76x26x1mm)	Comet Assay	ThermoScientific (Karlsruhe, D)
Spritze 1 und 10ml	Proteinisolierung/ western Blot	Hamilton (Höchst, D)

Material und Methoden

Zentrifugenröhrchen (15,30 und 50ml)	Comet Assay Zellkultur	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Fettstift	Zellfärbung	DACO (Hamburg, D)
Elektrophoresekammer	Comet Assay	Haustechnik Institut (Würzburg, D)
Fluoreszenzmikroskop	Zellfärbung	Diavert Leica (Wetzlar, D)
Inkubator	Zellkultur	Heraeus (Hanau, D)
Mikroskop	Comet Assay	Laborlux K Leica (Wetzlar, D) Nicon (Düsseldorf, D)
pH-Meter	Lösungsherstellung	Inolab (Weilheim, D)
Polyvinylfluorid (PVDF)-Membran	Western Blot	Roth (Karlsruhe, D)
Röntgenfilm	Western Blot	Amersham hyperfilm ECL, GE Healthcare limited (Buckinghamshire, UK)
Sterilwerkbank	Zellkultur	BSK-6, Anthos (Krefeld, D)
Wärmekammer	Zellfärbung	Heraeus (Hanau, D)
Zählkammer	Zellkultur	Neubauer, HBG (Gießen, D)

Zentrifuge	Zellkultur, Comet Assay, Proteinisolierung/ Westernblot	Rotanta 3502, Hettich (Tuttlingen, D)
-------------------	--	---

2.3 Zelllinie und Zellkultur

Die Zellen, die für diese Arbeit verwendet werden, sind Schweinenierenzellen aus der Zelllinie: LLC-PK1 (Quelle: ATCC ECA CC No. 8612112; Hersteller: CLS Heidelberg Ordnernr. 607264).

Die Zellen wurden in einem Medium kultiviert. Als Grundsubstanz diente das Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), dem 10% FBS, 1 % L-Glutamin 0,4% Penicillin mit Streptomycin und 2,5% Hepes zugesetzt wurden. Um einen Vergleich des Einflusses der Glucosekonzentration zu ermöglichen, wurde sowohl ein Medium mit Low-Glucose (1 g/l) als auch High-Glucose Medium mit (4,5 g/l) angewendet. Die Zelllinie stammt aus der Schweineniere, und ihre Verdopplungszeit beträgt 20 Stunden. Die Zellen müssen dabei zweimal pro Woche umgesetzt werden, um eine vollständige

Bewachung-Konfluenz zu vermeiden. Das Problem der Konfluenz besteht in der Kontaktinhibition der Zellen untereinander, so dass das Wachstum eingestellt wird. Dabei beträgt die minimale Zellzahl pro 20ml Medium-Flasche 250.000 Zellen/75ccm und die maximale Anzahl 4 Millionen/75ccm. Die Passagierung der Zellen läuft wie folgt ab: Bevor mit den Passagieren begonnen werden kann, werden Medium, Trypsin (PAA (Pasching, Österreich) und PBS in einem Wasserbad erwärmt auf 37° über 10 Minuten lang. Danach werden die Zellen aus dem Brutschrank genommen und unter die Easyflow gestellt. Nun erfolgt die Beurteilung des Mediums und des ungefähren Zellwachstum. Ist das Medium beispielsweise trüb, so kann eine Kontamination vorliegen. Als nächstes wird das Medium mit einer Glaspipette abgesaugt und verworfen. Dann werden die Zellen aufgrund ihrer starken Adhärenz zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 2ml Trypsin für 10 Minuten inkubiert, um sie schonend ablösen zu können. Nach den 10 Minuten

werden die Zellen aus dem Inkubator genommen und das Trypsin mit 5 ml Medium versetzt. Das Medium schwächt dabei die Wirkung des Trypsins durch Verdünnung ab und löst zudem die Zellen mithilfe einer Pipette. Das Abspülen der Oberfläche mit dem Medium wird mehrmals wiederholt. Anschließend wird die so entstandene Zellsuspension in ein Reagenzglas überführt. Als Nächstes erfolgt die Zellzahlbestimmung. Dafür werden nun $5\mu\text{M}$ aus der Zellsuspension in ein Eppendorfer-Gefäß pipettiert und mit $5\mu\text{M}$ Trypanblau versetzt. Trypanblau ist ein Farbstoff, der eine intakte Zellmembran nicht passieren kann. Ist die Zellmembran aber zerstört, so wird er von der Zelle aufgenommen. Somit stellt man sicher, dass nur vitale Zellen gezählt werden. Die Zählung erfolgt mit Hilfe der Zählkammer nach Neubauer. Diese Zellokammer besteht aus einem dicken Glasobjektträger mit einem Deckglas. Der Abstand von Objektträger und Deckglas beträgt genau $0,1\text{mm}$. Die Oberfläche des Objektträgers ist mit feinen Linien graviert und teilt sich in ein Raster auf.

Jedes der so entstandenen Quadrate hat einen Flächeninhalt von 1mm^2 somit ergibt sich folglich ein Volumen von $0,1\mu\text{l}$. Nun wird $10\mu\text{l}$ Trypitanblau versetzte Zellsuspension mit einer Pipette auf diese Zählkammer aufgetragen und unter einem Lichtmikroskop die Zellen in allen vier Quadraten gezählt. Danach kann mit Hilfe einer Formel die genaue Zellzahl bestimmt werden.

$$\underline{\text{Zellanzahl} \times 10.000}$$

$$\text{Konzentration} = \frac{\text{Anzahl der Quadrate (hier:4)} \times \text{Verdünnung}}{\text{Verdünnung}}$$

Nachdem die Zellenanzahl bestimmt wurde, konnte nun berechnet werden, wie viel Zellsuspension umgesetzt werden muss. Dabei wird normalerweise eine 20ml Flasche mit 500.000 Zellen versetzt und inkubiert. Nach zwei Tagen erfolgt eine erneute Umsetzung (Bastidas).

Die verwendete Zelllinie LLC-PK1 besteht aus Nierenzellen von Schweinen. Als Quelle dienten im Mai 2012 die CLS Heidelberg Order Nr. 607264. Sie gehören zu einer Gruppe adhärenter Zellen und wachsen auf der Oberfläche von Kulturflaschen. Wir benutzen als Kulturflaschen die Sarstedt Cell + Yellow Caps. Die Verdopplungszeit dieser Zelllinie beträgt 20 Stunden. Die Zellen werden im Schnitt zweimal pro Woche passagiert. Dabei sind mindestens 250.000 Zellen pro 75ccm in 20 ml und maximal 4 Mio. Zellen pro 75ccm in 20ml Medium empfohlen. Das Medium besteht als Grundsubstanz aus DMEM low Glucose (1g/l), versetzt mit 10% FBS, 1% L-Glutamin, 0,4% Pent/Strep und schließlich 2,5% HEPES. Als Besonderheit dieser Ziellinie ist zu beachten, dass sie besonders adhärent ist und bei dem Waschen zweimal mit PBS gespült werden muss, bevor das Medium abgezogen wird und die Behandlung mit Trypsin stattfindet. Aufbewahrt wird die Ziellinie eingefroren als Suspension mit 1 Mio. Zellen in Medium und einem Zusatz von DMSO 10%. Um eine

Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, legten wir eine maximale Anzahl von Passagierung von neun fest.

2.4 Puffer und Lösungen

Zur besseren Übersicht werden die verschiedenen Puffer und Lösungen den Methoden zugeteilt und in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Puffer und Lösungen und deren zugehörige Methode mit Inhaltsstoffen

Puffer und Lösungen	Methode	Inhalt
Lysepuffer	Comet Assay	2,5 M NaCl 100 mM EDTA 10 mM Tris 1% Natriumsarcosinat pH-Wert 10 einstellen mit NaOH
Lyselösung	Comet Assay	89 ml Lysepuffer 10 ml DMSO 1 ml Triton® x-100 Lichtgeschützt kühlen auf 4°
Elektrophoresepuffer	Comet Assay	120ml 5M NaOH 10ml 0,2M EDTA 2000ml H ₂ O Kühlen auf 4°C
Neutralisationspuffer	Comet Assay	0,4M TRIS pH-Wert 7,5 einstellen mit HCl
10x TBS	Western Blot	200mM TRIS-Base 5M NaCl pH-Wert 7,5 einstellen mit HCl

Material und Methoden

TBS-Tween 20	Western Blot	50 mM Tris 150 mM NaCl 0,05% Tween 20
Laufpuffer	Western Blot	25 mM Tris 192 mM Glycin 3 mM SDS
Transferpuffer	Western Blot	25 mM Tris 192 mM Glycin 20% MeOH
Ponceau S- Färbelösung	Western Blot	250mg Ponceau S 45ml H ₂ O 40ml Methanol 15ml Essigsäure
Ponceau S- Entfärber	Western Blot	82,5ml H ₂ O 7,5ml Methanol 10ml Essigsäure
Sammelgel	Western Blot	3,8ml H ₂ O 0,63ml Sammelgelpuffer 0,5ml Polyacrylamid (40%) 50µl SDS 10% 25µl APS (10%) 10µl TEMED
Trenngel	Western Blot	2,95ml H ₂ O 3,75ml Trenngelpuffer 3,15ml Polyacrylamid (40%) 100µl SDS 50µl APS 10%
RIPA-Puffer	Western Blot	50 mM Tris 150 mM NaCl 1mM EDTA 0,025% Natriumdesoxy cholat 1% Nonidet 1mM NaF

Material und Methoden

Blockierlösung	Western Blot	5% Milchpulver oder 1% BSA in TBS-T
PBS	Zellfärbung	0,14 M NaCl 2,68 mM KCl 3,23 mM Na ₂ HPO ₄ 1,47 mM KH ₂ PO ₄ pH-Wert 7,4 einstellen
Blockierlösung	Zellfärbung	1,2% Ziegenserum 1% Tween 20 0,3% TritonX100 86% PBS

2.5 Methoden

2.5.1 Comet Assay

Der Comet Assay dient dem Nachweis und der Identifizierung von DNA-Schäden in Form von Einzel- und Doppelstrangbrüchen und alkalilabiler Stellen. Basierend auf der Elektrophorese werden, die Zellen zunächst durch Lyse vorbehandelt. Die resultierenden DNA-Bruchstücke bewegen sich dann im elektrischen Feld -je nach DNA-Schaden- unterschiedlich schnell. Die DNA-Bruchstücke werden anschließend in Agarose eingebettet und gefärbt. Das resultierende Bild wird mittels Mikroskope betrachtet und anschließend durch eine Software ausgewertet.

Als Vorbereitung werden die kultivierten LLC-Zellen je nach Protokoll und Inkubationszeit mit verschiedenen chemischen Substanzen behandelt. Während der Inkubationszeit der Zellen wird der Lyse-Puffer (2,5 M NaCl, 100mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Na-Sarcosinat, pH 10) vorbereitet und bei 4°C gekühlt. Sowohl Objektträger als auch

Objektplättchen werden warmgestellt, wobei jeweils zwei pro Probe notwendig sind.

Die Behandlung der inkubierten Zellen erfolgt in mehreren Schritten. Zunächst wird das Medium von der Probe abgesaugt, anschließend wird diese zweimal mit PBS gespült. Schließlich werden die Zellen in einer zehnminütigen Behandlung mit Trypsin abgelöst und mit dem Medium erneut abgepuffert. Die so entstandene Suspension wird in große Eppendorfer Gefäße überführt.

Um die Zellen vom Zellüberstand zu trennen, werden die Eppendorfer Gefäße für fünf Minuten bei 1000 rpm in eine Zentrifuge gestellt. Dabei sinken die Zellen zu Boden und der Zellüberstand kann abgekippt werden. Das übriggebliebene Zellpellet wird direkt auf Eis gestellt.

Danach werden die Zellen mit 0,5% LMP (low melting point) Agarose (37°C) behandelt, die zuvor in PBS gelöst und aufgekocht wurde. Von der so gewonnenen Suspension werden 45µl auf einen mit HMP (high melting point) Agarose beschichteten

Objektträger aufgetragen und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Nachdem die in Agarose eingebetteten Zellen getrocknet sind, wird das Deckgläschen abgezogen und die Objektträger mit den Zellen lichtgeschützt in einer Küvette mit Lyselösung (66,75 ml Lysepuffer, 7,5 ml DMSO, 0,75 ml Triton X-100) für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Dabei wird durch die Zellyse die DNA zugänglich, indem die Membran und das Zytoplasma aufgelöst werden. Danach werden die Objektträger der Lyseküvette entnommen und in die Elektrophoresekammer gelegt. Dort verbleiben sie für 20 Minuten in eiskaltem (-18 Grad Celsius) alkalischen Elektrophoresepuffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA), um die Entwindung der DNA zu ermöglichen. Dann beginnt die Elektrophorese durch Anlegung eines elektrischen Feldes (25 Volt, 0,3 Ampere für 20 Minuten). Die geschädigte bruchstückhafte DNA (Einzel- oder Doppelstrangbrüche) wandert aus dem Zellkern in Richtung Pluspol, wobei die intakte Kern-DNA aufgrund der höheren Masse langsamer wandert.

Anschließend werden die Objektträger der Elektrophrosekammer entnommen und in einem Neutralisationspuffer (0,4 M Tris, pH 7,5) gewaschen. Danach werden sie fünf Minuten in kaltem (-18 Grad Celsius) Methanol fixiert und getrocknet. Abschließend erfolgt die Färbung der DNA mittels Gel Red Nucleic Acid Stain (Stammlösung 1:4 mit 1,4-diazabicyclo(2.2.2)octane (DABCO) verdünnt). Die Auswertung wurde am Mikroskop mit Hilfe des Programmes Komet 5 (Kinetic Imaging LTD, Liverpool, UK) in der 200-fachen Vergrößerung durchgeführt. Dabei wurden pro Slide 50 Zellen ausgewertet und das Ergebnis wird als Prozentanteil DNA als Schweif angegeben.

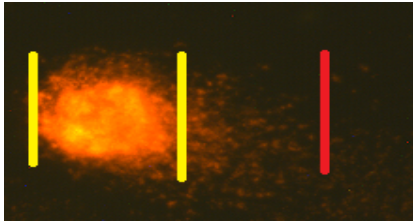


Abbildung 6: Beispielhafte Mikroskop Aufnahme einer Comet Assay Analyse, bei welcher die geschädigte DNA aus dem Zellkern wandert und sich als Kometenschweif darstellt. Die

2.5.2 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode zur Identifizierung von Proteinen. Dabei erfolgt die Trennung der Proteine bei der Elektrophorese entsprechend ihrer Größe, Ladung oder anderer Eigenschaften und die Übertragung auf eine Trägermembran. Anschließend wird das Protein identifiziert gemäß dem Antigen-Antikörper-Bindungs-Prinzip, bei dem der sekundäre Markierungsantikörper sich an die F_c-Region des primären Antikörpers bindet. Dann erfolgt die Markierung durch eine Chemilumineszenzreaktion über ein Enzym, das an den sekundären Antikörper gekoppelt ist (Burnette, 1981; Renart, Reiser, & Stark, 1979). Bei dieser Arbeit werden die folgenden Arbeitsschritte durchgeführt.

Zuerst erfolgt die Proteinisolierung. Dabei werden zur Vorbereitung 500.000 Zellen ausgesät und zwei Tage kultiviert. Am zweiten Tag werden sie entsprechend dem Versuchsprotokoll mit Angiotensin II und Sulforaphan behandelt.

Dann erfolgt die Proteingewinnung. Hierfür werden die Zellen mit Trypsin abgelöst und zweimalig mit PBS gewaschen. Anschließend wird die Zellsuspension abpipettiert und zwei Minuten bei 1000g zentrifugiert. Der dabei entstehende Zellüberstand wird verworfen und der Zellrest am Boden direkt für den Folgeversuch verwendet und auf Eis bei -18°C gelagert oder alternativ eingefroren bei -80°C . Als Nächstes erfolgt die Mischung des Zellrestes mit 50 μl RIPA-Puffer, der zuvor mit einem Phosphataseinhibitor in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und einem Protease-Inhibitor-Cocktail mit einer Konzentration von 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ versetzt wurde.

Die dadurch entstehende Zellsuspension wird anschließend zehnmal durch eine 26G-Kanüle einer Spritze gezogen. Danach wird das Gemisch in einem Eppendorf Gefäß gesammelt und auf Eis bei -18°C gelagert. Anschließend erfolgt die erneute Zentrifugierung bei 4°C und 5000g für 30 Minuten. Diesmal wird der entstandene Zellpellet am Boden

verworfen und die Proteinsuspension vorsichtig abpipettiert.

Nun folgt die Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976). Bei dieser Methode kommt es zu einer Komplexbildung der Proteine mit dem Bradford Reagenz. Diese Komplexe können nun mit Hilfe eines Photometers bei einer Absorptionslänge von 410nm quantifiziert werden. Anhand einer Kalibriergeraden wird der Proteingehalt berechnet. Dabei werden als Referenzwerte parallel zwei Standard -BSA- Proben mit 0,2,4,8,12,16 und 20µg pro 24ml genutzt. Das Ergebnis wird in Excel berechnet und in µg/µl angegeben. Nach Gewinnung der Proteine und Berechnung des Proteingehaltes kommt nun die Herstellung der Proben. Dafür werden die Proben gemäß dem folgenden Schema hergestellt. Jede Probe hat ein Gesamtvolumen von 20µl. Dies beinhaltet 5µl Roti-Load Beladungspuffer, Proteinlösung, so dass sich eine Proteinmenge 50µg ergibt, wobei die Proteinkonzentration je nach Experiment variiert. Das restliche verbleibende Volumen wird mit RIPA-

Puffer aufgefüllt. Anschließend wird das Gemisch für fünf Minuten auf 95° Celsius erhitzt. Ziel ist die Denaturierung der Proteine und deren Reduktion.

Im nächsten Schritt werden die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt. Dafür werden die Proben in die Taschen eines 12,5% Polyacrylamid-Gels gegeben. Dieses Gel besteht aus zwei Schichten. Die untere Schicht ist ein Trenngel und das obere Gel ein Sammelgel mit Taschen. Neben den Proben wird auch ein Marker pro Gel hinzugegeben, der sowohl zum Detektieren als auch zur Größenbestimmung dient. Als Parameterkonfiguration wurde in Vorexperimenten zu dieser Arbeit eine Spannung von 200V und eine Dauer von 60 Minuten gewählt. Durch das in Überschuss vorhandene SDS erhalten die Proteine eine negative Ladung, die zu ihrem Molekulargewicht proportional ist. Im elektrischen Feld teilen sich die Proteine dadurch nach ihrer Masse auf.

Nach der Auftrennung in die verschiedenen Proteingrößen erfolgt nun die Übertragung des

Proteinmusters (Blotten) auf eine Polyvinylidenfluoridmembran, wobei der zugrunde liegende Mechanismus die hydrophobe Wechselwirkung ist. Dies findet in einer Elektrophorese-Kammer mit Transferpuffer bei 100V für 60min statt. Nach dem Blotten wird zur Kontrolle der Transfereffizienz und der gleichmäßigen Beladung eine Färbung der Membranen mit einer Panceau S-Lösung durchgeführt. Anschließend wird das Ergebnis als Kopie dokumentiert. Dann wird die Membran entfärbt und in eine Blockierlösung für mindestens 120 Minuten inkubiert, um mögliche unspezifische Proteinbindungen zu vermeiden. Danach erfolgt die Auftragung des Primärantikörpers. Die Inkubation erfolgte bei allen Primärantikörpern über Nacht bei 4°C. Die Konzentration der Antikörper betrug bei Nrf 2 1:500, bei SOD 1:1000 und bei γ -GSCs 1:500.

Nach dreimaligem zehnminütigem Waschen mit einer Blockierlösung (je nach Antikörper mit BSA oder Milchpulver) erfolgt eine dreistündige Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten

Sekundärantikörper. Die Verdünnung des Sekundärantikörpers beträgt 1:1000 in Blockierungslösung. Im Anschluss werden die Membranen drei Mal für jeweils zehn Minuten zunächst mit Blockierungslösung und abschließend mit TBS-T gewaschen. Zur Detektion des gebundenen Sekundärantikörpers wird Luminol eingesetzt. Die Peroxidase oxidiert das Substrat Lumigen zu einem Acridiniumester, wodurch eine Chemilumineszenz entsteht, die durch Exposition auf einem Film detektiert werden kann. Die Expositionszeit liegt bei fünf bis zehn Minuten. Die Auswertung wird mit Hilfe des Programms ImageJ durchgeführt, wobei die Differenz der Helligkeiten ausgewertet wird. In den nachfolgenden Abbildungen 7-9 wird das Prinzip der Chemolumineszenz vereinfacht gezeigt und die Darstellung bei den angeschlossenen Versuchen.

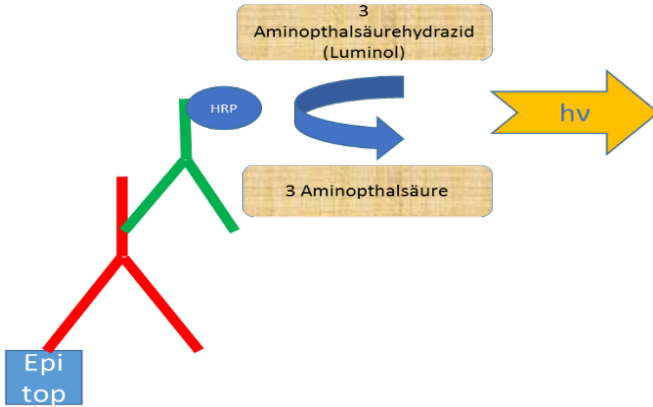


Abbildung 7: Bild zeigt die Bandenfärbung bei Nrf 2 mit unterschiedlicher Chemolumineszenz auf dem Film. Die erste markante Färbung ist der Marker.

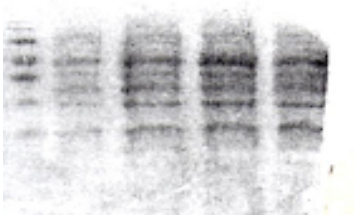


Abbildung 9: Bild ist eine Kopie nach Färbung der Membran mit Ponceau S zur Kontrolle.



Abbildung 8: Repräsentativer Western Blot zur Expression von SOD bei LLC PK1-Zellen nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II zu verschiedenen Zeitpunkten

2.5.3 Immunfärbung (Zellfärbung)

Als dritte Methode dient in dieser Arbeit die indirekte Immunfärbung. Das Prinzip besteht dabei aus der spezifischen Bindung eines bestimmten Abschnittes auf dem Antigen, dem Epitop, mit einem Antikörper (Primärantikörper). Dient dieser selbst als Markierung, spricht man von einer direkten Färbung. Bei der indirekten Färbung, wie sie in dieser Arbeit eingesetzt wird, wird ein mit einem Marker gekoppelter zweiter Antikörper (Sekundärantikörper) gegen das F_C-Fragment des Primärantikörpers eingesetzt. Bei den Experimenten wird dazu eine 6-Well Platte genutzt, auf deren Boden runde Deckgläser gelegt werden. Auf diesen Deckgläsern werden entweder 150.000 Zellen pro Ansatz ausgesät und anschließend über zwei Tage im Wärmeschrank angewachsen oder 250.000 Zellen pro Ansatz, die daraufhin nur einen Tag im Wärmeschrank anwachsen, genutzt. Danach werden die Zellen, je nach Versuchsansatz mit Angiotensin II und Sulforaphan behandelt. Anschließend erfolgt die Fixierung mit -20°C MeOH

für sieben Minuten und eine Waschung mit PBS für fünf Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler mit einer maximalen Geschwindigkeit von 40rpm, um eine mechanische Ablösung der Zellen zu verhindern. Anschließend werden die Deckgläser mit den fixierten Zellen mit einem Fettstift umrandet und es erfolgt die Inkubation der Zellen mit einer Blockierlösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur, um eine unspezifische Antikörperbindung zu verhindern. Nachfolgend wird der Puffer von den Zellen vorsichtig mit Hilfe von einem Wattetupfer abpipettiert und die Inkubation mit dem Primärantikörper für 1,5 Stunden bei 37°C in einer feuchten Kammer angeschlossen. Die Antikörperkonzentration gemischt mit Blockierlösung beträgt bei Nr 2 1:100, bei NF-κB 1:50 und bei γH2Ax 1:100. Anschließend werden die Zellen mit PBS drei Mal für zehn Minuten gewaschen. Alle nun folgenden Arbeitsschritte erfolgen in Dunkelheit, um eine unerwünscht chemische Reaktion zu vermeiden. Zunächst wird der Indocarbocyanin (Cy3) -konjugierte

Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:500 appliziert. Aufgrund seiner Absorption von 550nm und seiner Emission von 570nm erscheint er rot. Die Behandlung der Zellen dauert eine Stunde bei Raumtemperatur. Darauf folgt wieder eine Abfolge von Waschung der Zellen mit PBS für insgesamt 30 Minuten, aufgeteilt in drei Zeitintervalle á zehn Minuten. Abschließend werden die Zellen für zehn Minuten mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI, der 1:1000 mit PBS verdünnt wird, bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Farbstoff dient der Markierung der DNA und besitzt das Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 358nm und das Emissionsmaximum bei 461 nm. Er fluoresziert blau und wird als Kontrolle eingesetzt, um zu prüfen, ob die Zellen intakt und gefärbt sind. Anschließend werden die Zellen erneut zehn Minuten mit PBS gewaschen und mit einer konfokalen Matrix, einem wasserlöslichem Einschlussmittel, eingedeckt, um eine schnelle Reduktion der Fluoreszenzsignale zu verhindern. Die Aufbewahrung erfolgt in einer lichtgeschützten Schatulle. Zur Auswertung am

Mikroskop wird das Programm Capture Pro Fotos benutzt. Dabei werden die unterschiedlichen ankommenden Intensitäten des emittierten Lichtes über einen Sensor in ein digitales Signal umgewandelt und mit dem Programm ImageJ 1.40 dargestellt. Hier wurden 100 Zellen/Bild pro Versuchsansatz zur Auswertung herangezogen. Abbildung 10 stellt beispielhaft fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der LLC-PK1 Zellen nach Durchführung einer Zellfärbung dar.

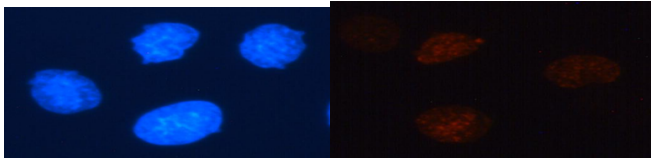


Abbildung 10 Beispielhafte fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der LLC-PK1 Zellen nach Durchführung einer Zellfärbung. Links zeigt eine Kontrollfärbung mit DAPI. Rechts stellt eine Aufnahme einer Nrf 2-Färbung mit cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper dar.

3 Ergebnisse

Alle Versuche und Versuchsreihen wurden mindestens dreimal zu unterschiedlichen Zeiten durchgeführt. Anschließend erfolgte die Datenanalyse mit Excel und zur Statistikauswertung wurde das Programm Python 3.8.7 benutzt. Die Daten der Experimente sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler. Die Signifikanztestung erfolgte mittels zweiseitig ungepaartem t-Test, dabei wurde ein p-Wert $\leq 0,05$ als signifikant betrachtet.

3.1 Nachweis DNA-Schaden durch Angiotensin II

Im ersten Schritt der Experimente wurden die LLC-PK1 Zellen mit einer Konzentration von 200 nM Angiotensin II behandelt und über verschiedene Zeiträume, in diesem Fall 30 Minuten, zwei Stunden, vier Stunden und 24 Stunden, inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf genetische Veränderung in Form von DNA-Strangbrüchen mittels Comet Assay untersucht. Hierbei zeigte sich, dass eine Exposition der Zellen mit Angiotensin II über alle Inkubationszeiten signifikant die

genetische Stabilität der LLC-PK1 Zellen verändert. Die meisten DNA-Schäden in Form von erhöhten Prozent DNA im Schweif zeigte sich bei zwei Stunden, dicht gefolgt von vier Stunden, siehe Abbildung 11. Auch eine deutlich längere Expositionszeit über 24 Stunden wies eine signifikant erhöhte Menge an DNA im Schweif (%) im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Insgesamt zeigten die Ergebnisse der anderen Expositionszeiten keine signifikanten Unterschiede untereinander.

Ergebnisse

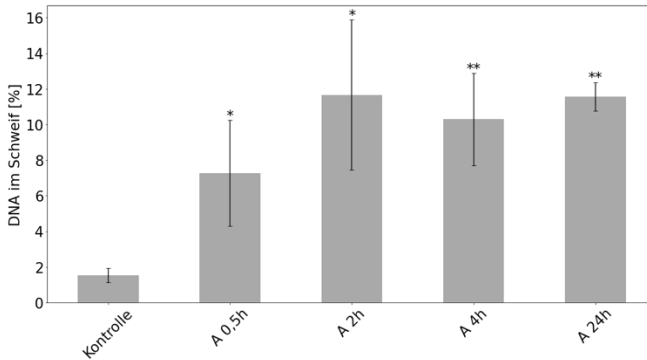


Abbildung 11: Nachweis von DNA-Schäden mittels Comet Assay in LLC PK1-Zellen nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II für 30 Minuten, 2 Stunden, 4 Stunden und über 24 Stunden *in vitro*. Als Negativkontrolle diente eine Behandlung der Zellen mit PBS für 2 Stunden. Gezeigt ist der prozentuelle Anteil von DNA im Schweif als Mittelwert mit positiver und negativer Standardabweichung. $N=3$; Signifikanztestung via zweiseitig ungepaartem t-Test, dabei gilt $*=p \leq 0,05$; $**=p < 0,01$.

Zur genaueren Untersuchung der Ergebnisse des Comet Assay wurde eine indirekte Immunfärbung für γ H2AX durchgeführt. Die γ H2AX-Färbung beruht auf der Detektion des Histons H2AX, das nach der Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen phosphoryliert wird. Da die Anzahl der γ H2AX-Foci mit der Menge der induzierten DNA-Doppelstrangbrüche korreliert, können diese quantifiziert werden. Jedoch ist dies

keine absolut quantitative und selektive Methode, da γ -H2AX nicht ausschließlich an DNA-Doppelstrangbrüchen entstehen kann, sondern auch unabhängig von Doppelstrangbrüchen nachweisbar ist. Somit ist davon auszugehen, dass jeder Doppelstrangbruch zu einer γ -H2AX Aktivierung führt, aber nicht alle γ -H2AX-Foci im Rahmen von Doppelstrangbrüche entstanden sind.

In dieser Untersuchung wurden die LLC PK1-Zellen abermals mit 200 nM Angiotensin II inkubiert und zu den gewählten Expositionszeiten von 30 Minuten, zwei Stunden, vier Stunden und 24 Stunden untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 12 zu sehen. Dabei zeigte sich über die Behandlungszeit von 30 Minuten, zwei Stunden und vier Stunden eine signifikant erhöhte Anzahl von γ H2AX/Zellkern. Der maximale Schaden in Form von DNA-Doppelstrangbrüchen durch Angiotensin II lag in diesen Versuchen zwischen 30 Minuten und vier Stunden. Eine weitere Zunahme des Schadens im Verlauf der 24 Stunden konnte nicht bestätigt werden. Im Gegenteil zeigte sich hier der DNA-

Schaden deutlich erniedrigt und nur marginal erhöht in Anbetracht des Niveaus der Kontrollgruppe. Analog zur Quantifizierung, Abbildung 11 und Abbildung 12, sind in Abbildung 13 repräsentative Bilder zu den *in vitro*-Untersuchungen der LLC-PK1-Zellen dargestellt, jeweils zu den unterschiedlichen Zeitpunkten nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II. Auch hier ist die Induktion der DNA-Schäden in der Zelllinie durch die Behandlung mit dem Peptidhormon Angiotensin II zu erkennen.

Ergebnisse

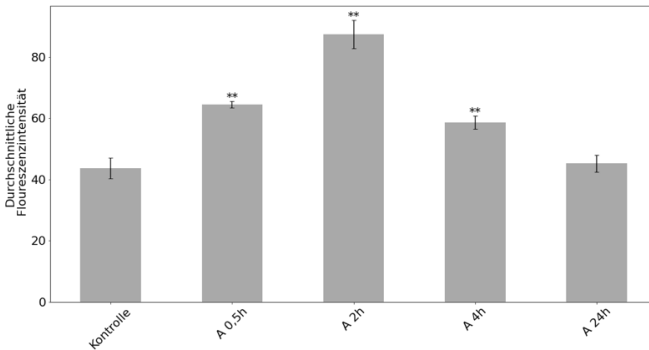


Abbildung 12: Nachweis von DNA-Schäden via γ H2AX-Färbung nach Inkubation der LLC PK1-Zellen mit 200 nM Angiotensin II *in vitro* über einen Zeitraum von 30 Minuten, 2 Stunden, 4 Stunden und 24 Stunden. Als Negativkontrolle diente eine Behandlung der Zellen mit PBS für 2 Stunden. Abgebildet sind die Mittelwerte und die positiven und negativen Standardabweichungen. Die Quantifizierung erfolgte durch Auswertung von 100 Zellkerne/Bild; N= 3 Experimente; Signifikanztestung vs. Kontrollgruppe via zweiseitig ungepaartem t-Test, dabei gilt $*=p \leq 0,05$; $**=p < 0,01$.

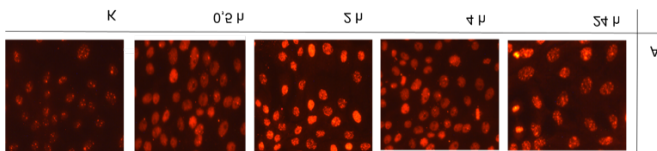


Abbildung 13 Bilder einer γ H2AX-Immunfluoreszenzfärbung der LLC PK1-Zellen. Dargestellt sind jeweils repräsentative Bilder zu den *in vitro* Untersuchung der LLC PK1-Zellen zu jeweils unterschiedlichen Zeitpunkten nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II. PBS diente als Negativkontrolle.

3.2 Veränderung der Transkriptionsfaktoren Nrf 2 und NF- κ B in Abhängigkeit von der Dauer der Angiotensin II Exposition

In den ersten Versuchsreihen hatte sich gezeigt, dass eine Exposition von Angiotensin zu einer genomischen Instabilität führte. Als Ursache postulierten wir die Entstehung von oxidativem Stress. Ein wichtiger Modulator des oxidativen Stresses und damit als indirekter Marker dient der Transkriptionsfaktor Nrf 2. In den nachfolgenden Versuchen stand somit die Auswirkung von Angiotensin II auf die Transkriptionsfaktoren Nrf 2 und NF- κ B im Vordergrund. Dabei wurden die LLC-PK1-Zellen erneut mit 200 nM Angiotensin II behandelt und für 30 Minuten, zwei Stunden, vier Stunden und 24 Stunden inkubiert. Hier zeigte sich zunächst eine Reduktion des Nrf 2-Levels/Zelle mit Minimum bei zwei Stunden, bei der sich analog zu den vorherigen Versuchen in der γ H2AX-Färbung der meiste genomische Schaden nachweisen ließ, siehe Abbildung 14. Im weiteren Verlauf stellte sich in den Zellreihen, die länger mit Angiotensin II

Ergebnisse

inkubiert wurden, ein Anstieg der Nrf 2 Menge/Zelle dar. Eine signifikante Erhöhung ergab sich erst nach 24stündiger Behandlung. Abbildung 15 zeigt repräsentative Bilder der durchgeführten Untersuchung.

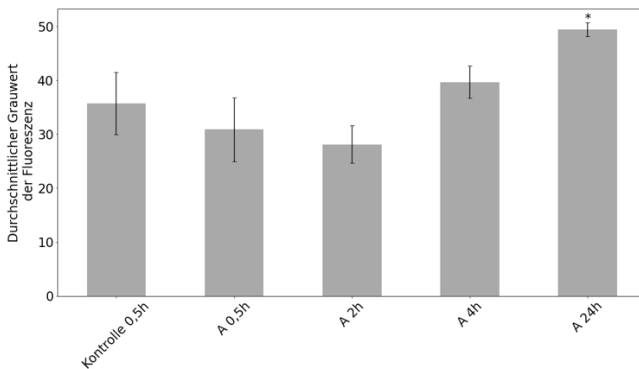


Abbildung 14: Darstellung der Veränderung des Nrf 2-Level in LLC-PK1-Zellen nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II über verschiedene Zeiträume via Nrf 2 Zellfärbung: 30 Minuten, 2 Stunden, 4 Stunden und 24 Stunden. Als Negativkontrolle diente eine Behandlung der Zellen mit PBS für 2 Stunden. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit positiver und negativer Standardabweichung. Zur Quantifizierung wurden pro Probe der durchschnittliche Grauwert (mean gray value) von 100 Zellkerne mit ImageJ ermittelt; N= 3 Experimente; Signifikanztestung vs. Kontrolle via zweiseitig ungepaartem t-Test, dabei gilt $*=p \leq 0,05$; $**=p < 0,01$.

Ergebnisse

Im anschließenden Versuch wurde nun der Transkriptionsfaktor NF- κ B genauer betrachtet. Dafür wurden erneut LLC PK1-Zellen mit 200 nM Angiotensin II für 30 Minuten, zwei Stunden, vier Stunden und 24 Stunden behandelt.

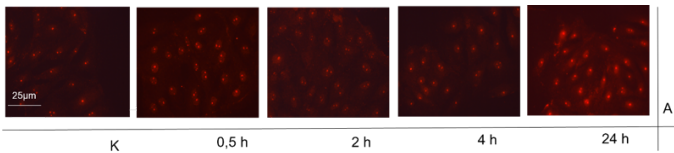


Abbildung 15: Bilder einer Nrf 2 -Zellfärbung der LLC PK1-Zellen. Dargestellt sind jeweils repräsentative Bilder zu den in vitro Untersuchung der LLC PK1-Zellen zu jeweils unterschiedlichen Zeitpunkten nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II. PBS diente als Negativkontrolle.

Ergebnisse

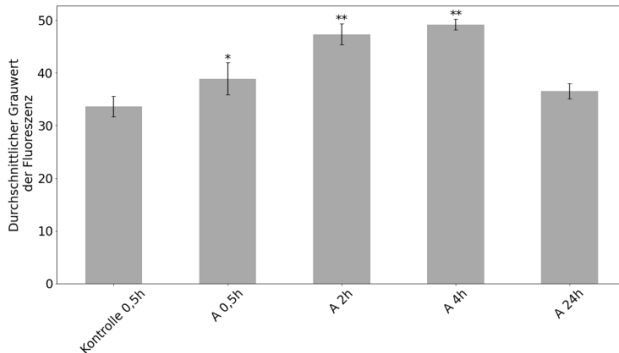


Abbildung 16: Auswirkung auf die NF- κ B-Menge in den LLC-PK1 Zellen nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II über verschiedene Zeiträume dargestellt via Zellfärbung auf NF- κ B: 30 Minuten, 2 Stunden, 4 Stunden und 24 Stunden. Als Negativkontrolle diente eine Behandlung der Zellen mit PBS für 2 Stunden. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit positiver und negativer Standardabweichung Zur Quantifizierung wurden pro Probe der durchschnittliche Grauwert (mean gray value) von 100 Zellkerne mit ImageJ ermittelt N= 3 Experimente; Signifikanztestung vs. Kontrolle via zweiseitig ungepaartem t-Test, dabei gilt $*=p < 0,05$; $**=p<0,01$.

Hier zeigte sich bei allen vier Inkubationszeiten ein Anstieg des NF- κ B Levels in den Zellen, siehe Abbildung 16 und Abbildung 17. Dabei ließ sich nach einer 30minütige Behandlung bereits ein signifikanter Anstieg des Transkriptionsfaktor NF- κ B in der Zelle nachweisen, wobei das Maximum

nach zwei beziehungsweise vier Stunden erreicht wurde. Vergleicht man die Entwicklung des NF- κ B Levels mit den Ergebnissen des Vorversuches zum Zellschaden in Form von DNA-Doppelstrangbrüchen durch Angiotensin II (Abbildung 12) zeigte sich ein ähnlicher Verlauf von nachweislich genomischen Schaden in der γ H2AX-Immunfluoreszenzfärbung der LLC PK1-Zellen und erhöhter NF- κ B-Menge/Zelle. Bei der Betrachtung der Veränderung der beiden Transkriptionsfaktoren ergab sich aufgrund des Verhaltensmusters mit konträren Verlaufsmuster die Hypothese, dass eine Interaktion der beiden Transkriptionsfaktoren im Rahmen eines negatives Feedback-Mechanismus besteht.

Ergebnisse

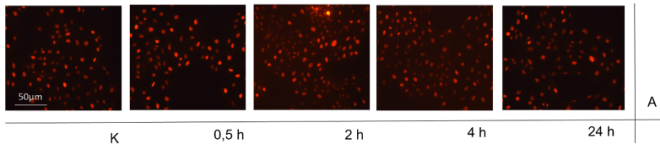


Abbildung 17 Bilder einer NF- κ B -Zellfärbung der LLC PK1-Zellen. Dargestellt sind jeweils repräsentative Bilder zu den in vitro Untersuchung der LLC PK1-Zellen zu jeweils unterschiedlichen Zeitpunkten nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II. PBS diente als Negativkontrolle.

3.3 Das anti-oxidative Potential von Sulforaphan

Als Nächstes wurde der anti-oxidative Effekt von Sulforaphan genauer untersucht. Dabei wurde bewusst in den weiteren Versuchen zwei Stunden Behandlungszeit als Untersuchungspunkt gewählt, da dort in den vorherigen Comet Assays der höchste DNA-Schaden für Angiotensin II nachgewiesen wurde (Abbildung 12). Somit wurden die LLC PK1-Zellen mit 200 nM Angiotensin II für zwei Stunden behandelt und in unterschiedlich hohen Konzentrationen (2 μ M, 5 μ M, 10 μ M und 20 μ M) von Sulforaphan versetzt. Hier zeigte sich bereits im direkten Vergleich eine tendenzielle Reduktion der DNA-Schäden von Angiotensin II im Vergleich zur Behandlung mit Sulforaphan, jedoch ergab sich keine statistische Signifikanz, siehe Abbildung 18. Betrachtet man die übrigen Zellen, so konnte bei allen getesteten Konzentrationen von Sulforaphan ein Rückgang des DNA-Schadens verzeichnet werden. Dabei zeigte sich die Kombination von Angiotensin II mit einer Konzentration von 5 μ M Sulforaphan das höchste

Ergebnisse

anti-oxidative Potential. Aufgrund dieses Ergebnisses fanden die weiteren Versuche mit Sulforaphan in der Konzentration von 5 μ M statt.

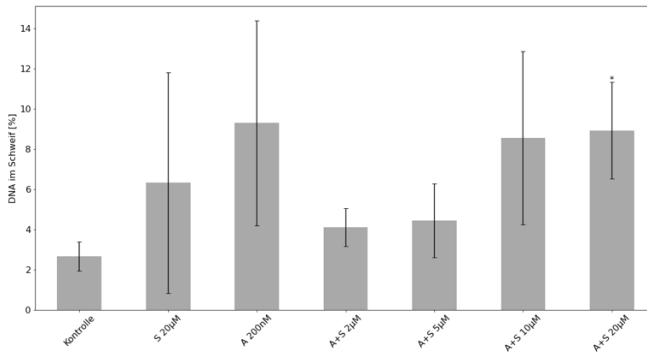


Abbildung 18: Nachweis von DNA-Schäden mittels Comet Assay in LLC PK1-Zellen nach 2 Stunden Behandlung mit Angiotensin II in Kombination mit unterschiedlichen Sulforaphankonzentrationen (2 μ M, 5 μ M, 10 μ M und 20 μ M) *in vitro*. Als Negativkontrolle diente eine Behandlung der Zellen mit PBS für 2 Stunden. Gezeigt ist der prozentuelle Anteil von DNA im Schweif als Mittelwert mit positiver und negativer Standardabweichung. N=3; Signifikanztestung vs. Kontrolle mittels zweiseitig ungepaartem t-Test, dabei gilt $*=p < 0,05$.

Wie bereits nachgewiesen hat Sulforaphan einen anti-oxidativen Effekt. Dieser Effekt wurde weiter untersucht. Dafür wurden LLC PK1-Zellen mit 200 nM Angiotensin II, 5 μ M Sulforaphan und in Kombination von 200 nM Angiotensin II und 5 μ M Sulforaphan über verschiedene Behandlungszeiträume untersucht. Analog zu den Vorversuchen wurde 30 Minuten, zwei Stunden, vier Stunden und 24 Stunden als Zeitpunkt gewählt. Anschließend wurden die Zellen auf DNA -Schäden im Comet Assay untersucht.

Ergebnisse

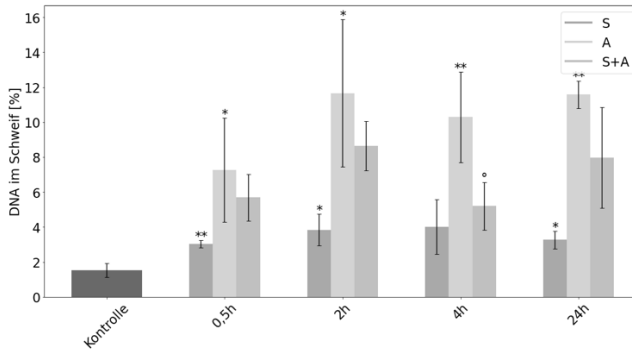


Abbildung 19: Nachweis von DNA-Schäden mittels Comet Assay in LLC PK1-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten (30 Minuten, 2 Stunden, 4 Stunden und 24 Stunden) nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II allein, mit 5 μ M Sulforaphan und in Kombination von 200 nM Angiotensin II und 5 μ M Sulforaphan in vitro. Als Negativkontrolle diente eine Behandlung der Zellen mit PBS für 2 Stunden. Gezeigt ist der prozentuelle Anteil von DNA im Schweif als Mittelwert mit positiver und negativer Standardabweichung. $N=3$; Signifikanztestung vs. Kontrolle mittels zweiseitig ungepaartem t-Test, dabei gilt $*=p < 0,05$; $**=p < 0,01$. Signifikanztestung kombinierte Behandlung vs. Angiotensin II mittels zweiseitig ungepaartem t-Test, dabei gilt $^{\circ}=p < 0,05$; $^{\circ\circ}=p < 0,01$.

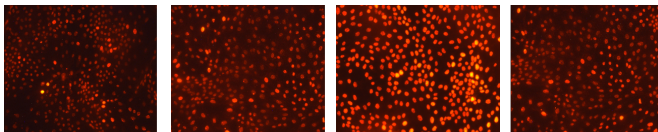


Abbildung 20: Bilder einer γ H2AX-Immunfluoreszenzfärbung der LLC PK1-Zellen. Dargestellt sind jeweils repräsentative Bilder zu den in-vitro-Untersuchung der LLC PK1-Zellen bei 4 Stunden nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II, 5 μ M Sulforaphan und kombiniert mit Angiotensin II und Sulforaphan. PBS diente als Negativkontrolle.

Dabei zeigte sich zunächst bei der Behandlung mit Angiotensin II passend zu den Vorversuchen bereits nach einer Behandlung von 30 Minuten ein signifikant erhöhter DNA-Schaden mit Maximum zwischen vier und 24 Stunden. Bei der Behandlung mit 20 μ M Sulforaphan ließ sich ebenfalls ein leicht erhöhten DNA -Schaden nachweisen über den gesamten Behandlungszeitraum von 24 Stunden, jedoch ohne signifikante Veränderung zu den einzelnen Behandlungszeitpunkten. Bei der kombinierten Behandlung der LLC PK1-Zellen ließ sich zu jedem Behandlungszeitpunkt eine Schadensreduktion verzeichnen, jedoch nur mit signifikantem Ergebnis bei vier Stunden, siehe Abbildung 19. In Abbildung 20 werden dazu jeweils repräsentative Bilder zu den in-vitro- Untersuchung der LLC PK1-Zellen bei 4 Stunden nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II, Sulforaphan und kombiniert mit Angiotensin II und Sulforaphan gezeigt.

Zusammenfassend erscheint sowohl die *in-vitro*-Induktion der DNA-Schäden durch Angiotensin II als

auch die anti-oxidative Wirkung von Sulforaphan zeitabhängig zu sein. In der nächsten Versuchsreihe wurden die LLC PK1-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Wasserstoffperoxid in Kombination mit 5 μM Sulforaphan behandelt und im Comet Assay auf DNA-Veränderungen und damit auf ihre genomische Stabilität untersucht. Es zeigte sich, dass mit steigender Wasserstoffperoxidkonzentration ein erhöhter Schaden an der DNA einhergeht (Abbildung 21). Betrachtet man die Zellen, die zusätzlich mit 5 μM Sulforaphan behandelt wurden, so konnte bei allen Konzentrationen eine deutliche Reduktion des DNA-Schadens vermerkt werden. Dabei stellte sich die Schadensreduktion bei der Kombination mit 100 μM Wasserstoffperoxid und 5 μM Sulforaphan am höchsten dar. Insgesamt suggerieren die Ergebnisse eine konzentrationsabhängige Wirkung des anti-oxidativen Potentials des Sulforaphan.

Ergebnisse

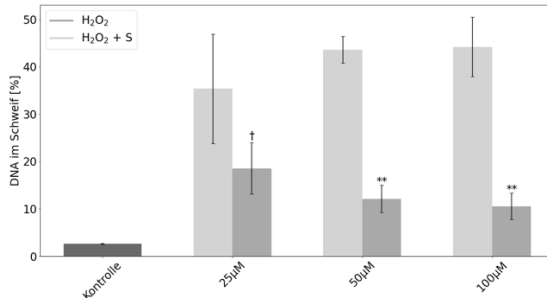


Abbildung 21: Nachweis von DNA-Schäden mittels Comet Assay bei LLC PK1-Zellen nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid in verschiedenen Konzentrationen und in Kombination mit 5 µM Sulforaphan *in vitro*. Als Negativkontrolle diente eine Behandlung der Zellen mit PBS für 2 Stunden. Gezeigt ist der prozentuelle Anteil von DNA im Schweif als Mittelwert mit positiver und negativer Standardabweichung. N=3; Signifikanztestung vs. Kontrolle mittels zweiseitig ungepaartem t-Test, dabei gilt $*=p < 0,05$; $**=p < 0,01$ und $†=p < 0,1$.

3.4 Der indirekte anti-oxidative Effekt über die Modulation des Transkriptionsfaktors Nrf 2

Zur Untersuchung einer möglichen Nrf 2-Aktivierung durch Sulforaphan wurden die LLC PK1-Zellen mit 5 μ M Sulforaphan allein über 30 Minuten, zwei Stunden, vier Stunden und 24 Stunden behandelt. Als Kontrollgruppe dienten Zellen, die mit PBS behandelt wurden. Zu allen Behandlungszeitpunkten ergab sich der Nachweis einer signifikant erhöhten Nrf 2-Menge pro Zelle, siehe Abbildung 22. Dabei ergab sich der höchste Wert für die Nrf 2-Menge pro Zelle nach vier Stunden.

Ergebnisse

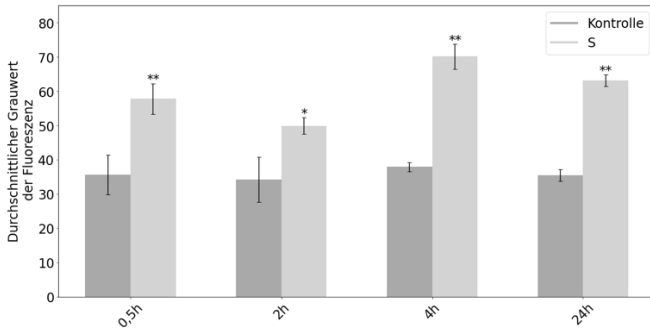


Abbildung 22: Auswirkung einer Behandlung mit 5 µM Sulforaphan auf das Nrf 2-Level in LLC PK1-Zellen mittels Nrf 2-Zellfärbung über die Zeiträume 30 Minuten, 2 Stunden, 4 Stunden und 24 Stunden. Als Kontrollgruppe diente PBS. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der Nrf2-Menge pro Zelle mit positiver und negativer Standardabweichung. Zur Quantifizierung wurden pro Probe der durchschnittliche Grauwert (mean gray value) von 100 Zellkerne mit ImageJ ermittelt. N= 3 Experimente; Signifikanztestung vs. Kontrolle via zweiseitig ungepaartem t-Test, dabei gilt *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$.

Zusammenfassend konnte in diesen Versuchen die Nrf 2-Induktion durch Sulforaphan nachgewiesen werden. Als nächstes wurden die LLC PK1-Zellen mit 200 nM Angiotensin II und in der Kombination von 5 µM Sulforaphan und 200 nM Angiotensin II behandelt.

Ergebnisse

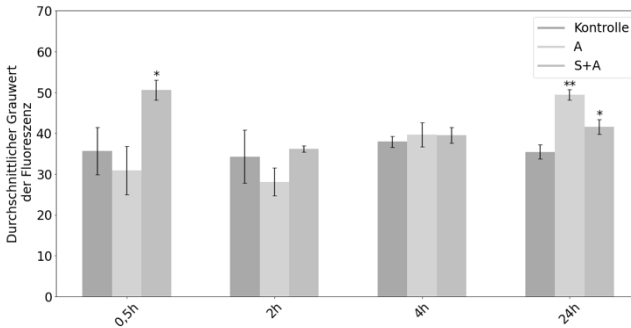


Abbildung 23: Nachweis der Veränderung des Nrf 2-Level in LLC PK1-Zellen mittel Nrf 2 Zellfärbung nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II und der Kombination 200 nM Angiotensin II mit 5 μ M Sulforaphan zu folgenden Zeiträumen: 30 Minuten, 2 Stunden, 4 Stunden und 24 Stunden. Als Kontrollgruppe diente PBS. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der Nrf2-Menge pro Zelle mit positiver und negativer Standardabweichung. Zur Quantifizierung wurden pro Probe der durchschnittliche Grauwert (mean gray value) von 100 Zellkerne mit ImageJ ermittelt N=3 Experimente; Signifikanztestung vs. Kontrolle via zweiseitig ungepaartem t-Test, dabei gilt *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$.

Wie in

Abbildung 23 und in Abbildung 24 zu sehen ist, ergaben sich bei der Behandlung der Zellen mit Angiotensin II allein bei 30 Minuten, 2 Stunden und 4 Stunden keine signifikanten Veränderungen im Nrf 2-Level im Vergleich zur Kontrollgruppe. Jedoch

ließ sich nach 24 Stunden ein signifikanter Anstieg von Nrf 2 vermerken. Anders verhielt es sich bei den Zellen, die kombiniert mit Angiotensin II und Sulforaphan behandelt wurden. Hier zeigte sich bereits ein signifikanter Anstieg der Nrf 2 Menge nach 30 Minuten. Bei zwei Stunden stellte sich ebenfalls eine erhöhte Menge an Nrf 2 dar, die sich jedoch nur deutlich von der Angiotensin II Gruppe unterschied und nicht mehr von der Kontrollgruppe. Bei vier Stunden konnten keine relevanten Unterschiede in den Gruppen festgestellt werden. Im weiteren zeitlichen Verlauf von 24 Stunden zeigte sich bei den Zellen, die kombiniert mit Angiotensin II und Sulforaphan behandelt wurden, ebenfalls eine signifikant erhöhte Menge an Nrf 2/Zelle im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Ergebnisse

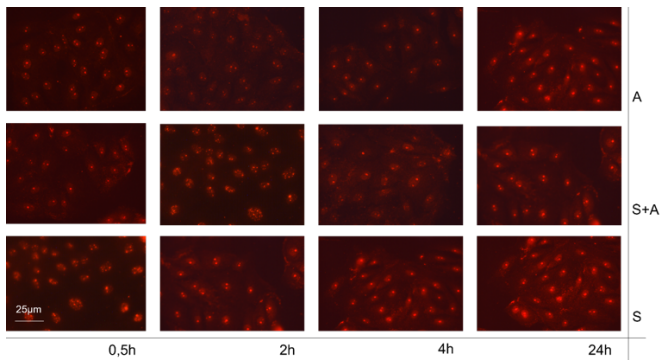


Abbildung 24: Bilder einer Nrf 2-Zellfärbung der LLC PK1-Zellen. Dargestellt sind jeweils repräsentative Bilder zu den *in-vitro*-Untersuchung der LLC PK1-Zellen nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II, 5 µM Sulforaphan und kombiniert mit Angiotensin II und Sulforaphan zu verschiedenen Zeiten.

3.5 Die Modulation des Transkriptionsfaktors

NF- κ B

Neben dem Transkriptionsfaktor Nrf 2 spielt auch der Transkriptionsfaktor NF- κ B eine wichtige Rolle im Rahmen der oxidativen Prozesse. Bereits im Vorfeld (Abbildung 16) konnte der Effekt von Angiotensin II auf NF- κ B dargestellt werden. Dort zeigte sich bei allen Inkubationszeiten ein signifikanter Anstieg des NF- κ B-Levels in den Zellen.

Ergebnisse

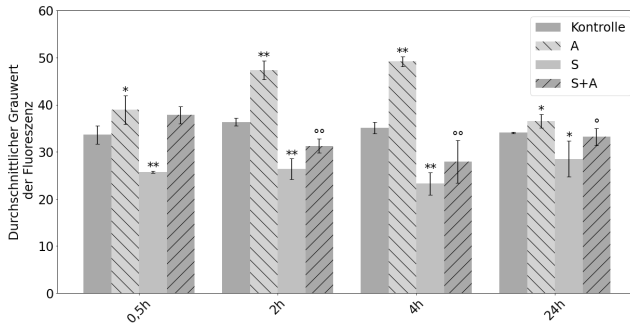


Abbildung 25: Modulation der NF- κ B-Menge/Zelle in LLC-PK1 Zellen nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II, 5 μ M Sulforaphan und kombiniert mit 200 nM Angiotensin II und 5 μ M Sulforaphan über verschiedene Zeiträume (30 Minuten, 2 Stunden, 4 Stunden und 24 Stunden) mittels NF- κ B-Zellfärbung. Als Kontrollgruppe diente PBS. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der NF- κ B-Menge pro Zelle mit positiver und negativer Standardabweichung. Zur Quantifizierung wurden pro Probe der durchschnittliche Grauwert (mean gray value) von 100 Zellkerne mit ImageJ ermittelt (N= 4 Experimente; Signifikanztestung vs. Kontrollgruppe via zweiseitig ungepaartem t-Test, dabei gilt * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$. Signifikanztestung vs. Angiotensin II via zweiseitig ungepaartem t-Test, dabei gilt ° = $p < 0,05$; °° = $p < 0,01$).

Betrachtete man nun die Ergebnisse in Abbildung 25 so wiesen die Zellen, die mit 5 μ M Sulforaphan allein behandelt wurden, über den gesamten Behandlungszeitraum ein signifikant reduziertes Level der NF- κ B Menge pro Zelle gegenüber der

Kontrollgruppe auf. Die Zellen, die sowohl mit 200 nM Angiotensin II als auch mit 5 μ M Sulforaphan behandelt wurden, wiesen keine signifikanten Veränderungen der NF- κ B Menge/Zelle zu allen Zeitpunkten auf. Außerdem zeigte sich ein signifikant reduziertes NF- κ B -Level im Vergleich zu den Zellen, die mit Angiotensin II behandelt wurden bei zwei, vier und auch bei 24 Stunden. Jedoch zeigte sich der Unterschied der NF- κ B Menge/Zelle zwischen zwei und vier Stunden mit höchster Signifikanz. In Abbildung 26 sind dazu exemplarische Bilder nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II in direktem Vergleich zur Behandlung mit 5 μ M Sulforaphan zu verschiedenen Zeiten dargestellt.

Ergebnisse

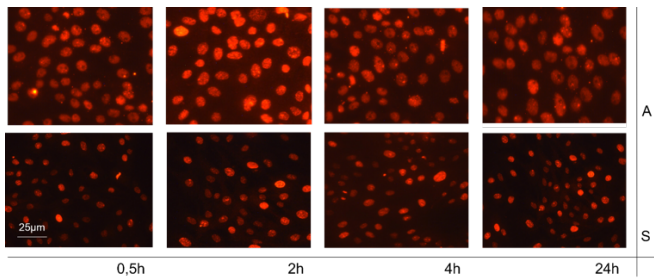


Abbildung 26: Bilder einer NF- κ B-Zellfärbung der LLC PK1-Zellen. Dargestellt sind jeweils repräsentative Bilder zu den *in-vitro*-Untersuchung der LLC PK1-Zellen nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II in direktem Vergleich zur Behandlung mit 5 μ M Sulforaphan zu verschiedenen Zeiten.

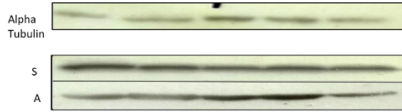
3.6 Nachweis der Nrf 2-induzierten Proteinexpression

3.6.1 Veränderung der SOD-Konzentration

In den vorherigen Versuchen wurde der Einfluss von Angiotensin II und Sulforaphan auf die genomischen Stabilität in Form von DNA-Veränderung und die Modulation der Transkriptionsfaktoren betrachtet. Als Nächstes wurde die Veränderung der Proteinexpression unter Einfluss der Nrf 2-Induktion untersucht. Als Vertreter dienten dafür die Expression von SOD und die γ GCS. Zu diesem Zweck wurde eine Zellgruppe alleinig mit Sulforaphan und die andere Zellgruppe alleinig mit Angiotensin II für 2, 4, 24 und 48 Stunden behandelt und anschließend auf die Expression von SOD untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 27 dargestellt.

Ergebnisse

A



B

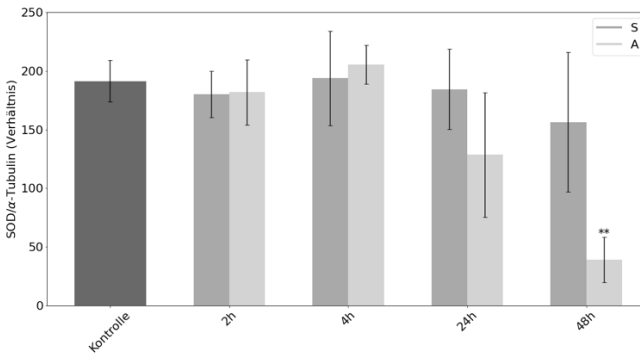


Abbildung 27: Western Blot: A: Exemplarische Darstellung zur Expression von SOD und dem Referenzprotein α Tubulin in den LLC-PK1 Zellen zu verschiedenen Behandlungszeitpunkten nach Behandlung mit A=Angiotensin II und S= Sulforaphan B: Analyse zur Expression von SOD und dem Referenzprotein α -Tubulin bei LLC PK1-Zellen nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II oder 5 μ M Sulforaphan über 2, 4, 24 und 48 Stunden. Als Kontrollgruppe diente PBS bei 2 Stunden. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der SOD-Proteinmenge mit positiver und negativer Standardabweichung. N= 3 Experimente; Signifikanztestung vs. Kontrolle via zweiseitig ungepaartem t-Test, dabei gilt **= $p < 0,01$. Quantifizierung erfolgte durch Beziehen von SOD auf α -Tubulin.

Hier stellten sich bei den Zellreihen, die mit Angiotensin II über zwei, vier, und 24 Stunden behandelt wurden, keine signifikanten Unterschiede zu ihrer Kontrollgruppe dar. Tendenziell präsentierte sich die SOD-Expression bei den Zellen, die über zwei und vier Stunden mit Angiotensin II behandelt wurden, zunächst leicht erhöht, im weiteren Verlauf von 24 Stunden stellte sich die SOD-Expression jedoch regredient dar und nach 48 Stunden mit signifikant erniedrigter Expression im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe. Die Zellen, die mit Sulforaphan behandelt wurden, wiesen über den gesamten Behandlungszeitraum von 48 Stunden keine signifikanten Veränderungen auf. Insbesondere zeigte sich hier kein Abfall der SOD-Expression bei 48 Stunden.

3.6.2 Veränderung der γ -GCSc-Konzentrationen

Zur weiteren Untersuchung des Einflusses von Sulforaphan und Angiotensin II auf die Expression von Enzymen, die zur Detoxifizierung und damit zum Schutz der Zellen gegenüber exogenen oder endogenen Noxen beitragen, wurde hier die Expression der γ -Glutamylcysteinsynthase (γ -GCS) genauer betrachtet. Dafür wurden die LLC PK1-Zellen erneut mit 5 μ M Sulforaphan und 200 nM Angiotensin II behandelt und nach zwei und vier Stunden auf die Expression des Proteins γ -GCSc untersucht.

Ergebnisse

A



B

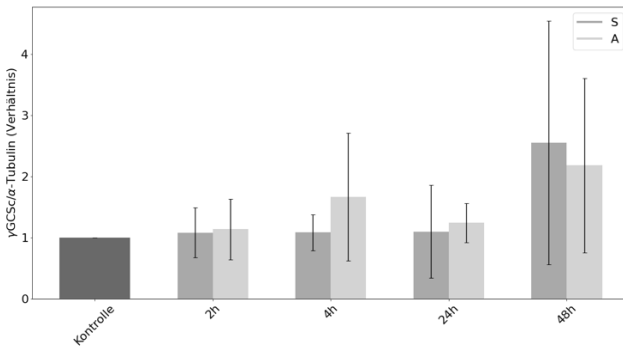


Abbildung 28: Western Blot: A: Exemplarische Darstellung zur Expression der γ -Glutamylcysteinsynthase und dem Referenzprotein α Tubulin in den LLC-PK1 Zellen zu verschiedenen Behandlungszeitpunkten nach Behandlung mit A=Angiotensin II und S= Sulforaphan; B: Analyse der Werte zur γ -Glutamylcysteinsynthase -Menge in LLC PK1-Zellen nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II, 5 μ M Sulforaphan über 2, 4, 24 und 48 Stunden. Als Kontrollgruppe diente PBS bei 2 Stunden. Dargestellt ist γ -Glutamylcysteinsynthase jeweils der Mittelwert mit positiver und negativer Standardabweichung. N= 4 Experimente; Quantifizierung erfolgte durch Beziehen der γ -Glutamylcysteinsynthase auf α -Tubulin.

Dabei ergab sich zu keinem Zeitpunkt der Untersuchung aufgrund der hohen Standardabweichung eine Signifikanz. Jedoch stellten sich Tendenzen dar, siehe Abbildung 28. So zeigten die Zellen, die mit Sulforaphan behandelt wurden, zunächst keine relevante Abweichung bei zwei, vier und 24 Stunden. Jedoch stellte sich bei einem 48-stündigen Behandlungszeitraum ein Anstieg der γ -GCSc Menge dar. Bei den Zellen, die mit Angiotensin II behandelt wurden, ließ sich bei vier und auch bei 48 Stunden ein leichter Anstieg der γ -GCSc im Vergleich zur Kontrollgruppe verzeichnen.

3.7 Zunahme des oxidativen Stresses bei hohen Zuckerkonzentrationen

Da das Maximum an DNA-Doppelstrangbrüchen bei der Versuchsreihe mit γ H2AX-Zellfärbung bei vier Stunden lag, siehe Abbildung 12, wurde dieser Zeitpunkt als Vergleichspunkt zur Beurteilung der Schadenszunahme durch einen zusätzlichen Faktor, in diesem Fall eine 4-fach erhöhte Glucosekonzentrationen gewählt. Anschließend wurden zwei Zellreihen entworfen, die jeweils mit 200 nM Angiotensin II, 5 μ M Sulforaphan und in Kombination mit 5 μ M Sulforaphan und 200 nM Angiotensin II für vier Stunden behandelt wurden. Dabei unterschieden sich die beiden Zellreihen in der Zuckerkonzentration: Die einen Zellen wurden mit einem Low Glucose Medium, das 1 g Glucose pro 1l Medium beinhaltet, behandelt und für die anderen Zellen wurde ein High Glucose Medium, das 4 g Glucose auf 1l Medium enthielt, benutzt. Die Resultate sind in Abbildung 29 dargestellt. In diesem Versuch zur γ H2AX-Zellfärbung ergab sich bei der Kontrollgruppe zwischen den Zellen mit

hoher und den mit niedriger Glucosekonzentrationen kein signifikanter Unterschied. Dagegen wiesen die Zellen, die neben 200 nM Angiotensin II mit erhöhten Glucosekonzentration behandelt wurden, einen deutlich erhöhten DNA-Schaden auf im Vergleich zu Zellen, die ebenfalls mit Angiotensin über vier Stunden behandelt wurden, jedoch nur einer niedrigen Glucosekonzentration ausgesetzt waren. Der DNA-Schaden, der in den Zellen entstanden ist, zeigte sich in beiden Gruppen signifikant zu ihrer jeweiligen Kontrollgruppe. Bei den Zellen, die sowohl mit Sulforaphan als auch mit Angiotensin II behandelt wurden, ergab sich bei beiden Gruppen eine Reduktion des Schadens, jedoch nur mit einer signifikanten Reduktion in der Zellgruppe, die gleichzeitig hoher Glucosekonzentration ausgesetzt war. Betrachtet man die Zellen, die alleinig mit Sulforaphan behandelt wurde, stellte sich, vor allem in der Zellgruppe mit niedriger Glucosekonzentration, eine signifikante Reduzierung des DNA-Schadens ein, während sich

Ergebnisse

bei den Zellen, die mit einer hohen Glucosekonzentration behandelt wurden, weiterhin ein signifikanter DNA-Schaden im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe nachweisen ließ, siehe Abbildung 29 und Abbildung 30.

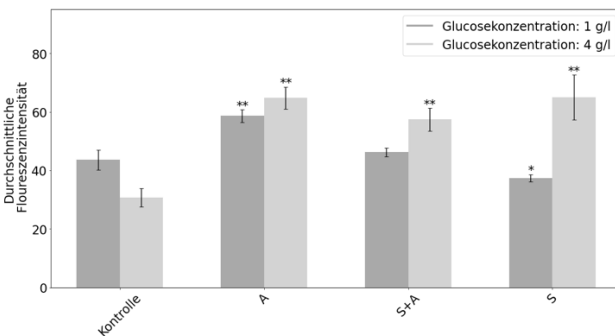


Abbildung 29: γ H2AX-Menge/Zelle in LLC PK1-Zellen mit hoher (4g/l) und niedriger (1g/l) Glucosekonzentration nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II, 5 μ M Sulforaphan und kombiniert mit 200 nM Angiotensin II und 5 μ M Sulforaphan über 4 Stunden in der γ H2AX Zellfärbung. Als Kontrollgruppe diente PBS. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit positiver und negativer Standardabweichung. N=3 Experimente; Signifikanztestung vs. Kontrolle via zweiseitig ungepaartem t-Test, dabei gilt *= $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

Ergebnisse

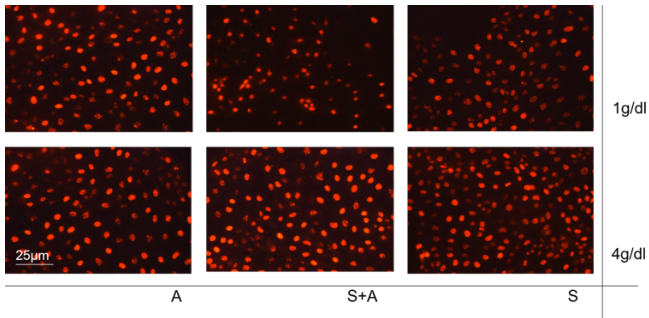


Abbildung 30: Bilder einer γ H2AX -Zellfärbung der LLC PK1-Zellen. Dargestellt sind jeweils repräsentative Bilder zu den *in-vitro*- Untersuchung der LLC PK1-Zellen nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II, 5 μ M Sulforaphan und in Kombination mit 200 nM Angiotensin und 5 μ M Sulforaphan nach einem 4h Behandlungszeitraum und mit unterschiedlicher Glucosekonzentration.

3.8 Verhalten der Transkriptionsfaktoren bei hoher Glucosekonzentration

Da sich in den vorangegangenen Untersuchungen signifikante Unterschiede bei der γ H2AX-Verfärbung zwischen den LLC PK1-Zellen, die dem vierfachen Glucosegehalt ausgesetzt waren, ergaben, wurden nun der Einfluss der Glucosekonzentration auf die Veränderung der Transkriptionsfaktoren Nrf 2 und NF- κ B untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 32 und in Abbildung 31 dargestellt. Für den Versuch wurden erneut die LLC PK1-Zellen vier Stunden entweder mit 5 μ M Sulforaphan, 200 nM Angiotensin II oder kombiniert mit sowohl 200 nM Angiotensin II und 5 μ M Sulforaphan behandelt. Die eine Zellreihe war zudem einer erhöhten Glucosekonzentration (4g/l Medium) ausgesetzt.

Ergebnisse

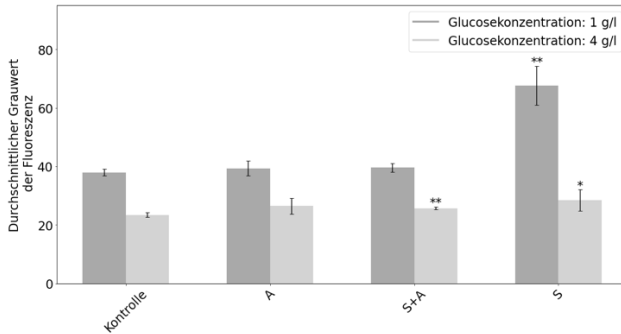


Abbildung 31: Auswertung der Nrf 2 Zellfärbung: Nrf 2-Menge/Zelle in LLC PK1-Zellen mit hoher (4g Glucose /L Medium) und niedriger (1g Glucose/L Medium) Glucosekonzentration nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II, 5 μ M Sulforaphan und kombiniert mit 200 nM Angiotensin II und 5 μ M Sulforaphan über 4 Stunden. Als Kontrollgruppe diente PBS. Zur Quantifizierung wurden pro Probe der durchschnittliche Grauwert (mean gray value) von 100 Zellkerne mit ImageJ ermittelt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit positiver und negativer Standardabweichung. N=3 Experimente; Signifikanztestung via zweiseitig ungepaartem t-Test, dabei gilt *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$ zur Kontrollgruppe.

Betrachtet man zunächst die Zellen, die niedriger Glucose (1g/1l Medium) ausgesetzt waren, so zeigte sich eine signifikant erhöhte Menge an Nrf 2 Zelle nach Behandlung mit 5 μ M Sulforaphan. Die Zellen, die mit Angiotensin II behandelt wurden, wiesen ebenso nach der kombinierten Behandlung

mit 200 nM Angiotensin II und 5 μ M Sulforaphan keine signifikanten Veränderungen auf. Zusammenfassend ließ sich auch hier die Nrf 2 Induktion durch Behandlung der Zellen mit 5 μ M Sulforaphan nachweisen. Betrachtet man nun die Zellen, die einer erhöhten Glucosekonzentration 4g/1l Medium ausgesetzt waren, so zeigten sich hier sowohl bei der Behandlung mit 5 μ M Sulforaphan allein als auch in der Kombination mit 200 nM Angiotensin II und 5 μ M Sulforaphan eine signifikante Veränderung zur Kontrollgruppe mit einer erhöhten Nrf 2 Menge/Zelle.

Ergebnisse

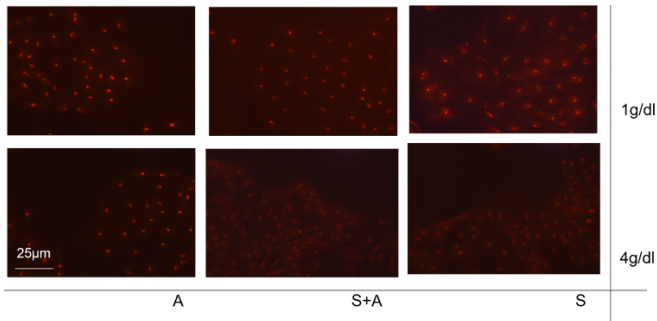


Abbildung 32: Bilder einer Nrf 2 -Zellfärbung der LLC PK1-Zellen. Dargestellt sind jeweils repräsentative Bilder zu den *in-vitro*-Untersuchung der LLC PK1-Zellen nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II, 5 µM Sulforaphan und in Kombination mit 200 nM Angiotensin und 5 µM Sulforaphan nach einem 4h Behandlungszeitraum und mit unterschiedlicher Glucosekonzentration.

Betrachtet man nun die Ergebnisse der Untersuchung zu NF-κB so stellte sich eine signifikant erhöhte Menge an NF-κB-Menge pro Zelle gegenüber ihren Kontrollgruppen bei den Zellen dar, die mit 200 nM Angiotensin II behandelt wurden (Abbildung 33 und Abbildung 34). Bei der kombinierten Behandlung von 200 nM Angiotensin II und 5 µM Sulforaphan wiesen beide Gruppen gegenüber ihrer Kontrolle eine signifikante Reduktion des NF-κB-Level auf. Unterschiede

Ergebnisse

ergaben sich bei der Behandlung mit 5 μ M Sulforaphan bei den Zellen, welche die vierfache Menge an Glucose erhielten. Hier zeigte sich im Gegensatz zu den Zellen, die mit niedriger Glucose inkubiert wurde, keine signifikante Reduktion der NF- κ B-Menge pro Zelle.

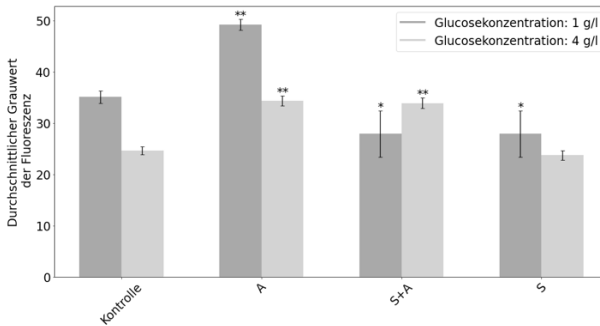


Abbildung 33: Auswertung der NF κ B-Zellfärbung: NF κ B-Menge/Zelle in LLC PK1-Zellen mit hoher und niedriger Glucosekonzentration nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II, 5 μ M Sulforaphan und kombiniert mit 200 nM Angiotensin II und 5 μ M Sulforaphan über 4 Stunden. Als Kontrollgruppe diente PBS. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit positiver und negativer Standardabweichung. Zur Quantifizierung wurden pro Probe der durchschnittliche Grauwert (mean gray value) von 100 Zellkerne mit ImageJ ermittelt. N= 3 Experimente; Signifikanztestung via zweiseitig ungepaartem t-Test, dabei gilt *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$.

Ergebnisse

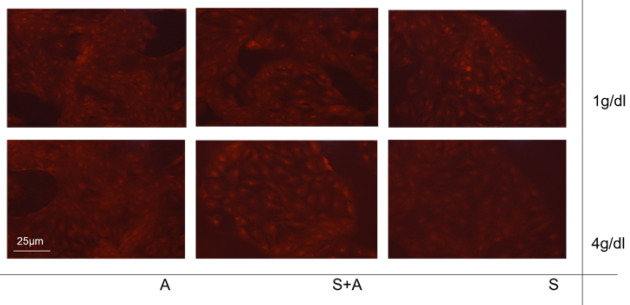


Abbildung 34: Bilder einer NFκB-Zellfärbung der LLC PK1-Zellen. Dargestellt sind jeweils repräsentative Bilder zu den *in-vitro*-Untersuchung der LLC PK1-Zellen nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II, 5 μM Sulforaphan und in Kombination mit 200 nM Angiotensin und 5 μM Sulforaphan nach einem 4h Behandlungszeitraum und mit unterschiedlicher Glucosekonzentration.

4 Diskussion

4.1 Angiotensin II, oxidativer Stress und induzierter DNA-Schaden

In mehreren Studien konnte bereits bei *in vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen das genotoxische Potential durch die Entstehung von oxidativem Stress durch Angiotensin II gezeigt werden (S. Brand et al., 2013; Nina Queisser et al., 2010). Auch in diesem Zellmodell bestätigte sich, dass durch die Behandlung mit Angiotensin II bei porkinen Nierenzellen vermehrt DNA-Schäden in den Zellen entstehen. Als Nachweis dienten zunächst verschiedene Comet Assay-Untersuchungen. Dabei wurde vor allem der Einfluss der Exposition auf die genomische Stabilität näher betrachtet. Dort ließ sich bereits nach zwei bis vier Stunden ein signifikanter DNA-Schaden nachweisen und auch nach einer Behandlung über 24 Stunden mit erhöhten Angiotensin II-Konzentrationen ließen sich deutliche genomische Veränderungen nachweisen. Dabei ist zu bedenken, dass bereits bei Angiotensin II-Konzentrationen von 50 pM als pathologische

Konzentrationen bei Hypertonikern bewiesen wurden und in unserem Versuch eine Konzentration von 200 nM Angiotensin II gewählt wurde, wodurch sich die beobachtete Wirkung potenziert und der Effekt zu hoch erscheinen mag (Schulz, Jankowski, Zidek, & Jankowski, 2014).

Betrachtet man die Ergebnisse der Zellfärbung auf γ H2AX, die als valider Marker für Doppelstrangbrüche der DNA gilt, so stellte sich auch hier eine Abhängigkeit von der Expositionsdauer dar. Als Prinzip dieser Immunzellfärbung wird bei DNA-Doppelstrangbrüchen, das Protein H2AX an Serin 139 über Kinasen phosphoryliert zu γ H2AX. Dieses veränderte Protein ist Ausgangspunkt für die Rekrutierung von DNA-Reparaturenzymen und dient diesen als Ansatzpunkt (Ward & Chen, 2001), so dass der γ H2AX-Spiegel als Indikator der endogene genomische Instabilität gesehen werden kann. Jedoch ist zu bedenken, dass in dieser Arbeit bei der γ H2AX-Färbung nicht zwischen Zelle und Zellkern explizit unterschieden wurde. Eine

Untersuchung komplexer DNA-Schäden durch Schwerionenbestrahlung ergab, dass zusätzlich zu dem genomischen Schaden ein spezifisches, jedoch schwächeres γ H2AX-Signal über den gesamten Zellkern hinaus verteilt, entsteht. Dieser Prozess wurde in humanen und murinen Zellen, sowie in Hamsterzellen sowohl bei Fibroblasten als auch in Tumorzellen nachgewiesen (Meyer, 2012; Ward & Chen, 2001). In den Versuchen ergab sich auch hier über alle Behandlungszeiten eine signifikant erhöhte Menge von γ H2AX pro Zellkern. Dabei lag das Maximum der Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen ebenfalls bei zwei bis vier Stunden. Eine weitere Zunahme des Schadens im Verlauf von 24 Stunden konnte nicht bestätigt werden. Im Gegenteil zeigte sich hier der DNA-Schaden deutlich regredient, jedoch weiterhin erhöht in Anbetracht des Niveaus der Kontrollgruppe. Ein möglicher Erklärungsansatz für diese Beobachtungen wäre, dass ähnlich einer niedrigen Angiotensin II-Konzentration, ebenso eine kurze Exposition zunächst eine über den G-Protein-

gekoppelten Membranrezeptor verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionen auslöst. Diese Wirkmechanismen sind bereits gut untersucht worden und unter anderem bei Siragy et. al und Kaschina et al. beschrieben worden. Hier soll nur auf die wichtigsten intrazellulären Signalwege eingegangen werden. Einer dieser Signalkaskaden beinhaltet die Aktivierung der Phospholipase C, woraufhin es zur Spaltung von Phosphatidylinositol in Inositol-1,4,5-triphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) kommt. Beide Substanzen agieren selbst als Second Messenger: IP3 bewirkt einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, wodurch es unter anderem neben einer Vasokonstriktion zu einer Ausschüttung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde kommt. DAG führt zu einer Aktivierung der Proteinkinase C, die über Phosphorylierung weiterer Proteine in der Folge ebenfalls zu einer Vasokonstriktion und zu einem Zellwachstum führt. Des Weiteren wurde gezeigt, dass über den AT1-Rezeptor Wachstumsfaktoren-Signalwege stimuliert werden, was zur Aktivierung

der Mitogen-Aktivierten Proteinkinase (MAPK), Janus Kinase (JAK) und den „signal transducers and activators of transcription“ (STAT) vorangeht. In der Folge kommt es zu über den JAK-STAT Signalweg zur Aktivierung mehrere „early growth response genes“ (Kaschina & Unger, 2003; Siragy, 2000). Darüber hinaus kommt es zur Aktivierung der NADPH-Oxidase und damit zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, was zu einer Veränderung des Redoxstatus der Zelle und damit eine wichtige Rolle bei der Modulation der Transkriptionsfaktoren Nrf 2 und NF- κ B spielt und in der Folge zu einer chronischer Inflammation führen kann (Brieger, Schiavone, Miller, & Krause, 2012; Datla et al., 2007; S. J. Kang et al., 2011; Zalba et al., 2005). Nicht nur die Niere scheint von einem Angiotensin II induzierten Schaden betroffen zu sein. Auch bei Untersuchungen am Herzen konnten eine erhöhte Bildung von oxidativem Stress bei erhöhten Angiotensin II-Konzentration nachgewiesen werden, beispielsweise im Rahmen von ischämischen Geschehen bei Myokardinfarkten

mit fibrotischen Umbau (Galle, 2004; Shah & Channon, 2004). Die DNA-Veränderung, die im Rahmen des oxidativen Stresses durch Behandlung mit Angiotensin II in den vorausgehenden Studien untersucht wurde, zeigte sich vielseitig. Sie präsentierte sich als Doppel- oder Einzelstrangbrüche, DNA-Protein-Crosslinks, Basenmodifikationen und Basenverluste (Breimer, 1990). Ein wichtiger Mechanismus ist dabei die oxidative Basenmodifikation. Es konnte bereits die Bildung von *8-Oxo-7,8-dihydro-2'desoxyguanosin (8-oxo-dG)* und *8-Oxo-7,8-dihydroguanin (8-oxo-Gua)* nachgewiesen werden, in deren Folge es zu einer Transversion von Guanin zu Thymin kommt, wodurch sich ein hohes mutagenes Potential ergibt (Mandel, 2015).

Ein weiterer Mechanismus zeigte sich bei *in vitro*-Experimenten als Methylierungsmodifikation des Cytosin, wodurch im Verlauf keine Bindung der Methyltransferasen stattfinden konnte, so dass ein DNA-Lesefehler, sowohl dieser Base als auch der Nachbarbase (Breimer, 1990) entstand. Dieser

Mechanismus konnte jedoch bisher in Tierversuchen nicht bestätigt werden. Auch mögliche Auswirkung auf die Epigenetik wurden bereits durch die Veränderung der DNA-Methylierung mit konsekutiver Histonmodifikation diskutiert, wodurch potentiell Tumorsuppressorgene nicht mehr abgelesen würden und zum anderen Protoonkogene zu Onkogenen aktiviert werden könnten (Franco et al., 2008; Ziech et al., 2011). Bei einem *in vivo*-Versuch bei Ratten konnte bereits das mutagene Potential von Angiotensin II nachgewiesen werden, bei der sich eine deutliche Akkumulation von Mutationen zeigte (Hartmann, Schulz, Epe, & Schupp, 2019).

In den 2018 aktualisierten europäischen ESH/ESC Leitlinien wird für alle Patienten inklusive Patienten mit Niereninsuffizienz oder Diabetes mellitus empfohlen, den Blutdruck zunächst auf < 140/90 zu senken (Williams et al., 2018). Dabei sind in der Erstlinientherapie vor allem Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmer, Angiotensin II-Rezeptor-Subtyp1-(AT1)-Blocker mit

langwirksamen Kalziumkanalblocker und Thiazid-ähnlichen Diuretika empfohlen (Mahfoud et al., 2019).

4.2 Angiotensin II, oxidativer Stress und der Einfluss auf die Transkriptionsfaktoren Nrf 2 und NF-κB

4.2.1 Modulation des Transkriptionsfaktors NF-κB

Es konnte bereits in vorherigen Studien nachgewiesen werden, dass durch die Exposition gegenüber Angiotensin II in den Zellen vermehrt oxidativer Stress entsteht (S. Brand et al., 2013; Landmesser et al., 2002; Takenaka et al., 2006). Ein wichtiger Modulator bei vielen zellulären Prozessen ist der Transkriptionsfaktor NF-κB. Er wurde bei vielen Prozessen als Schlüsselprotein identifiziert, beispielsweise der Inflammation, der Zellproliferation und der Apoptose (Bellezza et al., 2010; Bonizzi & Karin, 2004; Gloire et al., 2006; Karin & Ben-Neriah, 2000; Mattson & Camandola, 2001). Dabei liegt NF-κB unter physiologischen Bedingungen gebunden an spezifische Inhibitoren (IκB) inaktiv im Zytoplasma vor. Eine Zellstimulation

führt über eine Signalkaskade zur Phosphorylierung der Inhibitoren (I κ B-Proteine) mittels Kinasen. Als mögliche Stimulanzen dienen Zytokine, UV-Strahlung, ionisierte Radikale, genotoxische Substanzen und auch oxidativer Stress. Wie bereits in der Einleitung ausgeführt, kommt es durch die Phosphorylierung zur Ausbildung von Ubiquitin-Ligase Komplexen und es erfolgt ein rascher Abbau der Inhibitoren. Durch den Wegfall der Inhibitoren wird NF- κ B freigesetzt und es kommt zur Translokation in den Zellkern. Dort bindet es an einen Promotor oder an eine Enhancer-Region, so dass zahlreiche Gene abgelesen werden (Gloire et al., 2006; Karin & Ben-Neriah, 2000). In weiteren Untersuchungen ergab sich zudem der Verdacht, dass der Transkriptionsfaktor NF- κ B selbst redoxsensitiv sein könnte über die oxidative Modifikation des Cystein 62 in der Untereinheit p50. Dies würde bedeuten, dass abhängig von der Menge an produziertem ROS die Aktivierung von NF- κ B auch eine protektive Funktion übernimmt und zu einem Überleben der Zelle beitragen kann

(Mattson & Camandola, 2001). Eine dauerhafte Aktivierung führt jedoch zu einer Beeinträchtigung der Regulierung, bis hin zur Deregulation der Expression an NF- κ B-kontrollierten Genen. So zeigte sich beispielsweise, dass hohe Dosen von ROS durch eine Störung der Durchgängigkeit der Mitochondrienmembran vermehrt zu Apoptose und zu Nekrose führen (Halliwell & Gutteridge, 2015; Shah & Channon, 2004; Valko, Rhodes, Moncol, Izakovic, & Mazur, 2006).

In der Folge entstehen unkontrollierte Proliferation durch anti-apoptotische Regulierung mit Tendenz der Metastasierung und Angiogenese (Karin, 2006). Auch zeigte sich bei den Untersuchungen zu neurodegenerativen Erkrankung in Neuronen eine dauerhafte Aktivierung von NF- κ B (Mattson & Camandola, 2001; Richmond, 2002).

Betrachtet man nun die Ergebnisse der immunzytochemischen Untersuchungen des Transkriptionsfaktor NF- κ B, so zeigte sich bei den Versuchen ein Einfluss durch die Exposition der

LLC- PK1 Zellen durch Angiotensin II. Dabei fiel in einer direkten Reaktion nach 30 Minuten die NF- κ B-Menge/Zelle signifikant an und zeigte sich auch bei längerer Inkubation von Angiotensin II über zwei und vier Stunden in den Zellen signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei einer längeren Behandlungszeitraum über 24 Stunden stellte sich keine signifikante Erhöhung des NF- κ B-Levels mehr dar (Abbildung 16). Dieses Ergebnis erscheint nicht schlüssig, da bei anderen Studien gerade die chronische Inflammation über den Transkriptionsfaktor NF- κ B als eine der Ursachen des schädigenden Langzeiteffekt des Angiotensin II postuliert wurde, der in natura über den arteriellen Hypertonus mit chronischer Inflammation der kardiovaskulären Gefäße zum Umbau mit renaler Fibrose und schließlich zur Niereninsuffizienz führt (Bellezza et al., 2010; Mattson & Camandola, 2001; Naugler & Karin, 2008; N. Queisser & Schupp, 2012). Neben einer Ungenauigkeit im Rahmen der Messungen wäre eine Modulation durch den Transkriptionsfaktor Nrf 2 möglich, der im Rahmen

eines negativen Feedbackmechanismus‘ über eine vermehrte Expression des Enzyms HO-1 zu einer Verminderung des NF- κ B-Spiegels führt (Bellezza et al., 2010). Weiterhin wäre auch zu bedenken, dass der Behandlungszeitraum mit 24 Stunden zu kurz angesetzt wurde.

4.2.2 Modulation des Transkriptionsfaktors Nrf 2

Ein weiterer bereits bekannter Modulator der Zelle für das Redoxsystem ist der Nrf 2 (Aminzadeh, Nicholas, Norris, & Vaziri, 2013; da Costa et al., 2019; K. W. Kang, 2011). Betrachtet man Nrf 2 genauer, so wird seine Aktivität über das Kelch-like ECH assoziierte Protein 1 (KEAP 1) gesteuert. Dabei wird mit dem Adaptorprotein Cul3-based E3 ein Ubiquitinligase-Komplex gebildet (McMahon et al., 2003). Unter physiologischen Umständen liegt Nrf 2 inaktiv in einem Komplex mit KEAP1 vor. Durch Veränderung des oxidativen Potentials kommt es zu einer redoxabhängigen Thiolmodifizierung des KEAP1 und konsekutiv zur Dissoziation des Nrf 2/KEAP1-Komplexes. Dies führt zur vermehrten Translokation des freien Nrf 2

in den Nucleus. Dort bindet Nrf 2 über maf-Proteine an eine Gensequenz, die „antioxidative response element“ (ARE) genannt wird. Dadurch kommt es zu einer vermehrten Expression der ARE-codierten Proteine. Diese Enzyme spielen eine wichtige Rolle bei der Proliferation, Apoptose, zellulärer Homöostase, Inflammation und Ubiquitin-vermitteltem Abbau der Zelle (Kwak, Itoh, Yamamoto, & Kensler, 2002; Kwak et al., 2003). Als wichtigste bisher bekannte Repräsentanten zählen vor allem die detoxifizierende Enzyme Glutathion - S- Transferase (GSTs) und NAD(P)H Quinon-Oxidoreductase-1 (NQO1), die antioxidativ wirkenden Enzyme Hämoxxygenase 1 (HO-1) oder direkt ROS reduzierende Enzyme wie die GSH Peroxidase (Kobayashi & Yamamoto, 2005; Mani et al., 2013; McWalter et al., 2004).

Bereits bei anderen *in vivo*-Untersuchungen mit murinen Endothelialzellen konnte eine Suppression von Nrf 2 durch Angiotensin II und eine Assoziation mit renaler Fibrose nachgewiesen werden (S. J. Kang et al., 2011). Diese Ergebnisse werden

unterstützt durch die Untersuchungen an murinen Herzmuskelzellen, in denen nach Inaktivierung von Nrf 2 vermehrt Fibrosen entstanden sind mit anschließender Entwicklung einer linksventrikulären Dysfunktion (Chen et al., 2019). Somit ergibt sich ein therapeutisches Potential durch die Aktivierung von Nrf 2 (da Costa et al., 2019; Hybertson et al., 2011). Auch in den immunzytochemischen Untersuchungen zu Nrf 2 in dieser Arbeit zeigte sich bei den LLC PK1-Zellen nach der Behandlung mit Angiotensin II zunächst eine Reduktion des Nrf 2-Levels/Zelle mit Minimum bei zwei Stunden, bei der sich analog zu den vorherigen Versuchen in der γ H2AX-Färbung der meiste oxidative Schaden nachweisen ließ, siehe Abbildung 14. Im weiteren Verlauf stellte sich in den Zellreihen, die länger mit Angiotensin II inkubiert wurden, ein Anstieg der Nrf 2 Menge/Zelle dar. Eine signifikante Erhöhung ergab sich erst nach 24stündiger Behandlung, dargestellt in Abbildung 14. Dieser Effekt konnte bereits auch bei weiteren Versuchen bestätigt werden. So stellte sich bei

einem *in vivo*-Modell ein Progress über eine akute Entzündung zur tubulo-interstitiellen Fibrose und schließlich zur chronischen Nierenerkrankung (CKD) in Abhängigkeit der Expositionsdauer dar (Bader, Renders, & Müller, 2004; Siems, 2005). Auch bei Experimenten an murinen Leberzellen zeigte sich eine verzögerte Regeneration bei den Nr1h2-Knockout-Mäusen, die auf eine erhöhte Belastung durch oxidativen Stress und vermehrte Inflammation zurückgeführt wurde und vermehrt zu hepatozelluläre Karzinome (HCC) führte (Karin & Dhar, 2016).

4.3 Oxidatives Potential von Sulforaphan

Die inhibitorische und protektive Wirkung von Isothiocyanaten bei bestimmten Tumoren wurde bereits in mehreren Studien demonstriert (Chiao et al., 2002; Chipmanw, 1996; Conaway et al., 2005; Mahéo et al., 1997). Auch bei anderen Zellmodellen, konnte nachgewiesen werden, dass Sulforaphan die Expression von Zytochrom P450 bewirkt und damit über die Induktion von Phase-I Enzymen die Zelle protegert (Haouzi et al., 2000;

Mahéo et al., 1997). Zum anderen sind auch die Phase II-Enzyme betroffen, die notwendig sind zur Detoxifizierung und damit zum Schutz der Zellen gegenüber exogenen oder endogenen Noxen. Zudem zeigte sich, dass Sulforaphan die Apoptose beeinflussen kann, was unter anderem zur Inhibierung der Angiogenese führt (Bertl et al., 2006; Thejass & Kuttan, 2006). So konnte in einer Studie bei Lungenadenomen eine niedrige Konversionsrate zum Karzinom nachgewiesen werden, wenn Sulforaphan verabreicht wurde (Conaway et al., 2005). Analog zu den Ergebnissen bei den porkinen Nierenzellen, konnte auch bei *in vitro*-Untersuchungen bei menschlichen Epithelzellen der Leber eine Protektion der DNA durch Verminderung von Strangbrüchen durch niedrige Sulforaphankonzentrationen nachgewiesen werden (Barcelo, Mace, Pfeifer, & Chipman, 1998). In dieser Arbeit zeigte sich ebenfalls bei den LLC PK1-Zellen bei allen getesteten Konzentrationen von Sulforaphan ein Rückgang des DNA-Schadens, jedoch ergab sich

kein direkter Zusammenhang mit der Höhe der Sulforaphan-Konzentration. Als möglicher Wirkmechanismus wäre ein direkter anti-oxidativer Effekt von Sulforaphan über die reaktionsfreudige Thiolgruppe möglich. Um dies zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit in den LLC PK1-Zellen Sulforaphan selbst mit einem Oxidans, hier repräsentiert durch Wasserstoffperoxid (H_2O_2), behandelt. Es zeigte sich zunächst, dass Wasserstoffperoxid mit steigender Konzentrationen Schaden an der DNA hervorruft. In Kombination mit Sulforaphan konnte bei allen Wasserstoffperoxid-Konzentrationen eine signifikante Reduktion des DNA-Schadens vermerkt werden (Abbildung 29), wodurch sich auch eine direkte anti-oxidative Wirkung von Sulforaphan verifizierte. Als nächsten Punkt wurde der Einfluss der Expositionsdauer auf den protektiven Effekt betrachtet. Dabei zeigte sich im Comet Assay, dass bei der Behandlung der Zellen mit Sulforaphan im zeitlichen Verlauf über 24 Stunden keine signifikante Reduktion des Schadens zur Kontrollgruppe stattfindet, jedoch

zeigte sich eine deutliche Reduktion des Schadens im Vergleich zur Angiotensin II Gruppe. Passend dazu zeigten klinische Beobachtung, dass Nrf 2-Aktivatoren beispielsweise Curcumin und Sulforaphan langfristig zu einer deutlichen Besserung der Nierenfunktion bei bereits bekannter mittlerer Niereninsuffizienz führt (Pergola et al., 2011). Somit scheint Sulforaphan seinen protektiven Effekt voll zu entfalten bei gleichzeitiger Behandlung mit einem schädigenden Agens oder bereits bestehenden Schäden. Weiterhin wäre eine Untersuchung im längerfristigen Intervall anzustreben, was in dieser Arbeit in Ermangelung der Zeit fehlt, um die klinischen Beobachtungen am Zellmodell zu untersuchen.

4.3.1 Nachweis der Modulation der Transkriptionsfaktoren Nrf 2 und NF- κ B

In einigen Zelllinien wurde nachgewiesen, dass Zellen durch die Behandlung mit Antioxidantien (ROS) als zelluläre Reaktion auf den Stresszustand Enzyme der Phase II induzieren. Der Signalweg, welcher für die Regulation der Stressantwort

verantwortlich gemacht wird, ist der Nrf2-Signalweg (Hybertson et al., 2011). Dabei ließ sich bei Folgeversuchen eine Nrf2 Induktion durch Sulforaphan Nrf 2 nachweisen (Bai et al., 2015; Cui et al., 2012). Auch in unserem Modell ließ sich bei den Nierenzellen, die mit Sulforaphan behandelt wurden, eine deutlich erhöhte Nrf Menge/Zelle nachweisen, was eine Nrf2 Induktion postuliert. Weiterhin kam ein signifikant reduziertes Level NF- κ B/Zelle über den gesamten Behandlungszeitraum gegenüber der Kontrollgruppe zu Darstellung, das sich über den gesamten Behandlungszeitraum streckte. Dies konnte ebenfalls bei humanen Prostatazellen beobachtet werden (Heiss, Herhaus, Klimo, Bartsch, & Gerhäuser, 2001) Dabei zeigte sich der protektive Effekt von Sulforaphan im Sinne einer verminderten genomischen Instabilität im Comet Assay und bei der Immunfärbung (Abbildung 13 und Abbildung 21).

4.3.2 Nachweis der Nrf 2-induzierten Proteinexpression

Im durchgeführten Western Blot wurden die LLC - PK1 Zellen auf eine erhöhte transkriptionelle Expression der Nrf 2- Zielgene Superoxiddismutase-1 und der γ -Glutamylcysteinsynthase (γ GCSs), nun bekannt unter der γ -Glutamylcysteinylase, untersucht. Grundsätzlich sind die Glutamylcysteinylasen Enzyme, die als Heterodimer aus einer regulatorischen und einer katalytischen Einheit bestehen. Sie katalysieren die Reaktion von Glutamat mit Cystein zu dem Dipeptid γ -Glutamylcystein und bilden damit den erste Schritt in der Synthese von Glutathion, welches als Redoxpartner bei vielfältigen Stoffwechselprozessen eine wichtige Rolle spielt (Gasper et al., 2005; Solis et al., 2002) (Franklin et al., 2009). Bei einem *in vitro*-Versuch zu Leberzellen von Mäusen konnte bereits eine Assoziation der Nrf 2-Aktivität mit der Proteinexpression der Glutamylcysteinylasen nachgewiesen werden

(Mani et al., 2013). In unserem Zellmodell der Nierenzellen zeigte sich bei den Zellen, die mit Angiotensin II behandelt wurden, ein erhöhtes Level an γ GCSc im Vergleich zur Kontrollgruppe. Betrachtet man die Zellen, die mit Sulforaphan behandelt wurden, genauer auf die Expression von γ GCSc hin, so zeigt sich hier nicht nur eine vermehrte Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe, sondern auch im Vergleich zur Gruppe der Zellen, die mit Angiotensin II behandelt wurden. Die höchste γ GCSc -Konzentration wiesen die Zellen auf, die sowohl mit Angiotensin II als auch mit Sulforaphan behandelt wurden. Auch eine *in-vivo*-Untersuchungen ergab eine durch Sulforaphan assoziierte erhöhte Expression von detoxifizierende Enzymen bei Mäusen mit Diabetes induzierten Schäden der Aorta über eine Induktion von Nrf 2 (Al Janobi et al., 2006). Untersucht man die Zellen auf die Expression von SOD-1 so zeigte sich in der Zellreihe, die mit Angiotensin II behandelt wurde, bereits nach zwei Stunden ein deutlich erhöhtes Proteinlevel der Superoxiddismutase-1 mit einem

Maximalwert bei 24 Stunden und anschließend einer deutlichen Regression bei 48 Stunden. Somit zeigte sich in diesem Versuch passend zum maximalen oxidativen Schaden auf Transkriptionsebene ein direkter Anstieg der Nrf 2 Aktivität und in der Folge eine Erhöhung des Proteinlevels der Superoxiddismutase-1. Diese Ergebnisse werden unterstützt durch eine Untersuchung an Ratten, bei denen sich bei ischämischen Myokardschäden eine Sulforaphan induzierte erhöhte Expression anti-oxidativ wirkender Enzyme nachweisen ließ (Ruhee, Ma, & Suzuki, 2020). Die Expression scheint dabei von der Expositionsdauer abzuhängen. Bei Zellen, die sowohl mit Angiotensin II und mit Sulforaphan kombiniert behandelt wurden, präsentierte sich ein erhöhtes Proteinlevel an SOD im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dabei lag hier das Maximum bei vier Stunden. Betrachtet man das Proteinlevel an SOD bei den Zellen, die mit Sulforaphan behandelt wurden, so zeigt sich im Vergleich zur Angiotensin II Gruppe ein deutlich niedrigeres Level, jedoch

ebenfalls erhöht zur Kontrollgruppe. Gemäß unserer Hypothese einer Sulforaphan induzierten Nrf 2-Aktivierung zeigen sich die SOD-Konzentrationen zur Kontrollgruppe erhöht, im Vergleich zu Behandlung mit Angiotensin II.

4.4 Zunahme des oxidativen Stresses bei hohen Zuckerkonzentrationen

Weltweit nimmt die Zahl der kardiovaskulären Ereignisse zu. Dabei zeigte sich in der PURE-Studie, die beim ESC 2019 vorgestellt wurde, dass sich etwa 70% der Herz-Kreislauf-Erkrankungen auf bestimmte Risikofaktoren zurückführen lassen (U. Lindblad, Boström, Torén, & Lissner). Einen der Risikofaktoren stellt neben dem Hypertonus die Hyperglykämie dar. Als Folge der chronischen Hyperglykämie (Diabetes mellitus) treten sowohl mikrovaskuläre als auch makrovaskuläre Komplikationen auf. Auch ergab sich in mehreren retrospektiven Studien eine Korrelation zwischen dem Nachweis von erhöhten Zuckerspiegel im Blut und dem Auftritt von Nierenkarzinomen (Lindblad et al., 1999). In unseren Versuchen konnte ebenfalls

nachgewiesen werden, dass erhöhte Zuckerkonzentrationen zu einer vermehrten genomischen Instabilität führen. Zellen, die zudem noch mit Angiotensin II, als wichtigem Regulator des Blutdrucks, behandelt wurden, wiesen massive DNA-Schäden auf. Demgegenüber konnte bei Zellen, die mit einem Antioxidans behandelt wurden, in unserem Fall Sulforaphan, ein reduzierter DNA-Schaden nachgewiesen werden. Interessanterweise wiesen Zellen, die mit der Kombination von Sulforaphan und Angiotensin II behandelt wurden, eine deutliche Reduktion des Schadens auf sogar im Vergleich zu der Zellgruppe, die mit niedriger Glucose behandelt wurde. Diese Ergebnisse werden unterstützt durch Untersuchungen aus anderen Zellreihen. Dort zeigte sich bei *in-vitro*-Experimenten, dass hohe Zuckerwerte zu deutlich erhöhten Werten von proinflammatorischen Proteinen wie Interleukin-6 und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) führen. Dabei konnte bei mesangialen Zellen von Mäusen ein möglicher Pathomechanismus postuliert werden.

Mit steigenden Zuckerkonzentrationen zeigte sich eine Aktivierung der Proteinkinase C und erhöhte Konzentrationen von ROS ließen sich als Zeichen von erhöhtem oxidativen Stress nachweisen (Ha et al., 2002; Xu et al., 2014).

In den folgenden Versuchen wurde die Veränderung des Nrf 2-Levels als möglicher Pathomechanismus untersucht. Dabei zeigte sich in der Zellfärbung bereits bei den Zellen, die mit erhöhter Glucosekonzentration (4g Glucose/1l Medium) behandelt wurden ohne zusätzliches Agens, eine deutlich erhöhte Menge von Nrf 2/Zelle. Weiterhin wiesen Zellen, die sowohl mit der erhöhten Glucosekonzentration als auch mit Angiotensin II behandelt wurden, einen deutlichen Anstieg des Nrf 2 Levels auf. Diese Ergebnisse werden bestätigt durch Studien an Ratten mit diabetischer Neuropathie, bei denen durch Sulforaphan ebenfalls eine Nrf 2-Induktion und eine NF-κB-Inhibition induziert wird (Cui et al., 2012). Dabei zeigte sich eine konzentrationsabhängige Aktivierung von Nrf 2. Je höher die

Zuckerkonzentration und die Menge an Sulforaphan waren, umso stärker war die Aktivierung mit konsekutivem Anstieg von HO-1 und NQO1 als Zeichen der vermehrten Nrf 2 induzierten Transkription antioxidativer und detoxifizierender Enzyme. Weiterhin zeigte sich, dass HO-1 zu einer verbesserten Insulinsensitivität und zu einer reduzierter Adipositas führt (M. Li et al., 2008), wodurch das kardiovaskuläre Risiko deutlich gesenkt wird. Nicht ganz geklärt ist, ob NF- κ B-Suppression direkt durch Interaktion mit Sulforaphan entsteht. Dabei wird eine mögliche Aktivierung der IKK durch Sulforaphan selbst diskutiert oder durch den negativen Feedbackmechanismus über die vermehrte Nrf 2-Induktion. Letztendlich ließ sich in den Zellen passend zur niedrigen Aktivität von NF- κ B auch reduzierte Proteinmengen an NF- κ B induzierten Genexpression gefunden werden unter anderem von iNOS, TNF- α und COX 2 (Heiss et al., 2001). Sie alle sind wichtige Mediatoren der akuten und chronischen Entzündung.

Als weiterer Pathomechanismus wird die Hyperinsulinämie angesehen, die zur Überstimulation des IGF-Rezeptors führt und darüber ein Tumorwachstum begünstigt. Der genaue intrazelluläre Pathomechanismus ist dabei noch unklar (Stern & Haffner, 1986). Auch in verschiedenen Tierexperimenten konnte die Wirksamkeit anderer antioxidativ wirksamer Substanzen beispielsweise *N-Acetylcystein* bei Ratten gezeigt werden (Nogueira et al., 2018). Aber trotz solcher experimentellen Befunde ist die Datenlage zur klinischen Wirksamkeit von bekannten Antioxidantien in der Prävention oder Therapie von diabetischen kardiovaskulären Komplikationen beispielsweise der diabetischen Nephropathie sehr gering. Als mögliche Ursache wurde neben der Unbeständigkeit der ROS aufgrund ihrer Reaktivität auch die Lokalisation diskutiert, bei der ein exogenes Antioxidans an intrazelluläre Reaktionen teilnehmen muss (Kandhare, Mukherjee, & Bodhankar, 2017).

5 Zusammenfassung

Ausgangspunkt der Arbeit ist die klinische Beobachtung, dass Patienten mit arteriellem Hypertonus vermehrt Nierenerkrankungen entwickeln. Dabei zeigten sich in der Subgruppenanalyse vor allem erhöhte Inzidenzen der Niereninsuffizienz und der Nierenzellkarzinome. Als möglicher Pathomechanismus steht das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS-System) im Vordergrund. Dabei wird postuliert, dass erhöhte Angiotensin II-Spiegel zu einem Missverhältnis zwischen den Oxidations- und Reduktionspartnern in der Zelle führen, wodurch sich das oxidative Potential der Zelle ändert, und es vermehrt zur Bildung von Radikalen (ROS) kommt, die meist ungepaarte Elektronen in der Valenzschale oder instabile Verbindungen enthalten, wodurch sie besonders reaktionsfreudig mit Proteinen, Lipiden, Kohlenhydraten und auch der DNA interagieren. In der Folge kommt es zu DNA-Veränderungen in Form von Doppel- oder Einzelstrangbrüchen, DNA-Protein-Crosslinks, Basenmodifikationen und

Basenverlusten, wodurch sich ein hohes mutagenes Potential ergibt. Dieser Ansatz zur Pathophysiologie bestätigte sich auch an den hier verwendeten porkinen Nierenzellmodell. Dabei zeigte sich nicht nur eine Veränderung der genomischen Stabilität nach Exposition gegenüber erhöhten Angiotensin II-Spiegeln, sondern auch eine Veränderung der DNA in Abhängigkeit von der Expositionsdauer der Zellen. Als nächster Schritt konnte die Modulation der Transkriptionsfaktoren Nrf 2 und NF- κ B durch die Behandlung mit Angiotensin II und Sulforaphan nachgewiesen werden. Bei der Behandlung mit Sulforaphan ließ sich eine Nrf 2-Induktion nachweisen mit vermehrter Expression von antioxidativen und detoxifizierender Enzyme. Weiterhin zeigte sich im Rahmen der Behandlung erniedrigte NF- κ B-Level. Bei der Modulation durch Angiotensin II stellte sich zunächst ein signifikant erniedrigtes Level an Nrf 2 in den Zellen dar, das im Verlauf von 24 Stunden anstieg und konsekutiv ließ sich eine maximale Proteinexpression zwischen 24 und 48 Stunden

messen. Weiterhin wiesen die Zellen, die mit Angiotensin II behandelt wurden, erhöhte NF- κ B Mengen/Zelle auf. Zudem zeigte sich der Einfluss erhöhter Glucosekonzentrationen auf eine progrediente genomischen Instabilität, die Veränderung der Transkriptionsfaktoren mit erhöhter Nrf 2-Induktion und mit Deregulation des Transkriptionsfaktors NF- κ B wurde durch die Behandlung mit Sulforaphan nachgewiesen. Aufgrund dieser Rolle in der Tumorgenese sind mittlerweile einige Bestandteile des NF- κ B- und des Nrf 2-Signalweges und auch Nrf 2-Aktivatoren wie Sulforaphan wichtige Zielstrukturen für die Entwicklung neuer Medikamente und Therapieoptionen. Besonders zeigt sich hierbei die Wichtigkeit bei Diabetes induzierten kardiovaskulären Folgeschäden mit frühzeitiger medikamentöser Behandlung.

6 Literaturverzeichnis

- Abraham, N. G., Kushida, T., McClung, J., Weiss, M., Quan, S., Lafaro, R., . . . Wolin, M. (2003). Heme oxygenase-1 attenuates glucose-mediated cell growth arrest and apoptosis in human microvessel endothelial cells. *Circulation research*, 93(6), 507-514.
- Ackermann, D. (2013). *Vergleichende Untersuchungen von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen: Zelluläre Effekte von Hydroxyzimtsäuren, Flavonoiden und Isothiocyanaten*. Universitäts- und Landesbibliothek der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf,
- Akl, C., Akik, C., Ghattas, H., & Obermeyer, C. M. (2017). Gender disparities in midlife hypertension: a review of the evidence on the Arab region. *Women's midlife health*, 3(1), 1-10.
- Aktories, F., Hofmann, Starke. (2009). *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie* (10 Auflage ed.). München: Elsevier GmbH, Urabn & Fischer Verlag.
- Al Janobi, A. A., Mithen, R. F., Gasper, A. V., Shaw, P. N., Middleton, R. J., Ortori, C. A., & Barrett, D. A. (2006). Quantitative measurement of sulforaphane, iberin and their mercapturic acid pathway metabolites in human plasma and urine using liquid chromatography–tandem electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 844(2), 223-234.
- Aminzadeh, M. A., Nicholas, S. B., Norris, K. C., & Vaziri, N. D. (2013). Role of impaired Nrf2 activation in the pathogenesis of oxidative stress and inflammation in chronic tubulo-interstitial nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 28(8), 2038-2045.

- Baboolal, K., & Meyer, T. W. (1994). The effect of acute angiotensin II blockade on renal function in rats with reduced renal mass. *Kidney international*, 46(4), 980-985.
- Bader, N., Renders, L., & Müller, M. (2004). Oxidativer Stress bei Hämodialysepatienten-auslösende Faktoren und mögliche Behandlung. *Aktuelle Ernährungsmedizin*, 29(05), 254-258.
- Bai, Y., Wang, X., Zhao, S., Ma, C., Cui, J., & Zheng, Y. (2015). Sulforaphane protects against cardiovascular disease via Nrf2 activation. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2015.
- Barcelo, S., Mace, K., Pfeifer, A., & Chipman, J. (1998). Production of DNA strand breaks by N-nitrosodimethylamine and 2-amino-3-methylimidazo [4, 5-f] quinoline in THLE cells expressing human CYP isoenzymes and inhibition by sulforaphane. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 402(1), 111-120.
- Bastidas, O. *Technical Note - Neubauer Chamber Cell Counting*.
- Bellezza, I., Mierla, A. L., & Minelli, A. (2010). Nrf2 and NF- κ B and their concerted modulation in cancer pathogenesis and progression. *Cancers*, 2(2), 483-497.
- Bertl, E., Bartsch, H., & Gerhäuser, C. (2006). Inhibition of angiogenesis and endothelial cell functions are novel sulforaphane-mediated mechanisms in chemoprevention. *Molecular cancer therapeutics*, 5(3), 575-585.
- Bonizzi, G., & Karin, M. (2004). The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in immunology*, 25(6), 280-288.

- Border, W. A., & Noble, N. A. (1998). Interactions of transforming growth factor- β and angiotensin II in renal fibrosis. *Hypertension*, 31(1), 181-188.
- Bradford, N. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of a protein isolated from red cell membranes. *Anal. Biochem*, 72(248), e254.
- Brand, S. (2013). *Oxidativer Stress und DNA-Schäden induziert durch das Peptidhormon Angiotensin II in vivo: Identifizierung des AT1-Rezeptors und reaktiver Sauerstoffspezies als ursächliche Faktoren*. Würzburg, Universität Würzburg, Diss., 2013,
- Brand, S., Amann, K., & Schupp, N. (2013). Angiotensin II-induced hypertension dose-dependently leads to oxidative stress and DNA damage in mouse kidneys and hearts. *J Hypertens*, 31(2), 333-344. doi:10.1097/HJH.0b013e32835ba77e
- Brandt, U. (2014). Oxidoreduktasen und oxidativer Stress. In *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie* (pp. 252-256): Springer.
- Breimer, L. H. (1990). Molecular mechanisms of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis: the role of DNA base damage. *Molecular carcinogenesis*, 3(4), 188-197.
- Brieger, K., Schiavone, S., Miller, F. J., & Krause, K. H. (2012). Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Medical Weekly*, 142. doi:ARTN w13659
- DOI 10.4414/smw.2012.13659
- Brooks, J. D., Paton, V. G., & Vidanes, G. (2001). Potent induction of phase 2 enzymes in human prostate cells by sulforaphane. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 10(9), 949-954.
- Burnette, W. N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium

- dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical biochemistry*, 112(2), 195-203.
- Calabrese, V., Guagliano, E., Sapienza, M., Panebianco, M., Calafato, S., Puleo, E., . . . Stella, A. G. (2007). Redox regulation of cellular stress response in aging and neurodegenerative disorders: role of vitagenes. *Neurochemical research*, 32(4-5), 757-773.
- Chen, R.-R., Fan, X.-H., Chen, G., Zeng, G.-W., Xue, Y.-G., Liu, X.-T., & Wang, C.-Y. (2019). Irisin attenuates angiotensin II-induced cardiac fibrosis via Nrf2 mediated inhibition of ROS/TGF β 1/Smad2/3 signaling axis. *Chemico-biological interactions*, 302, 11-21.
- Cheng, Y., & Rong, J. (2017). Therapeutic potential of heme oxygenase-1/carbon monoxide system against ischemia-reperfusion injury. *Current pharmaceutical design*, 23(26), 3884-3898.
- Chiao, J., Chung, F.-L., Kancharla, R., Ahmed, T., Mittelman, A., & Conaway, C. (2002). Sulforaphane and its metabolite mediate growth arrest and apoptosis in human prostate cancer cells. *International journal of oncology*, 20(3), 631-636.
- Chipmanw, J. K. (1996). CYP2E1-mediated mechanism of anti-genotoxicity of the broccoli constituent sulforaphane.
- Conaway, C. C., Wang, C.-X., Pittman, B., Yang, Y.-M., Schwartz, J. E., Tian, D., . . . Chung, F.-L. (2005). Phenethyl isothiocyanate and sulforaphane and their N-acetylcysteine conjugates inhibit malignant progression of lung adenomas

- induced by tobacco carcinogens in A/J mice. *Cancer research*, 65(18), 8548-8557.
- Corrao, G., Scotti, L., Bagnardi, V., & Sega, R. (2007). Hypertension, antihypertensive therapy and renal-cell cancer: a meta-analysis. *Curr Drug Saf*, 2(2), 125-133.
- Cui, W., Bai, Y., Miao, X., Luo, P., Chen, Q., Tan, Y., . . . Cai, L. (2012). Prevention of diabetic nephropathy by sulforaphane: possible role of Nrf2 upregulation and activation. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2012.
- da Costa, R. M., Rodrigues, D., Pereira, C. A., Silva, J. F., Alves, J. V., Lobato, N. S., & Tostes, R. C. (2019). Nrf2 as a potential mediator of cardiovascular risk in metabolic diseases. *Frontiers in pharmacology*, 10, 382.
- Datla, S. R., Dusting, G. J., Mori, T. A., Taylor, C. J., Croft, K. D., & Jiang, F. (2007). Induction of Heme Oxygenase-1 In Vivo Suppresses NADPH Oxidase-Derived Oxidative Stress. *Hypertension*, 50(4), 636-642.
- Dinkova-Kostova, A. T., & Kostov, R. V. (2012). Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease. *Trends in molecular medicine*, 18(6), 337-347.
- Franco, R., Schoneveld, O., Georgakilas, A. G., & Panayiotidis, M. I. (2008). Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer letters*, 266(1), 6-11.
- Franklin, C. C., Backos, D. S., Mohar, I., White, C. C., Forman, H. J., & Kavanagh, T. J. (2009). Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Molecular aspects of medicine*, 30(1-2), 86-98.

- Galle, J. (2004). Atherosklerose und Arteriitis. *Herz*, 29(1), 4-11.
- Gaspar, A. V., Al-janobi, A., Smith, J. A., Bacon, J. R., Fortun, P., Atherton, C., . . . Mithen, R. F. (2005). Glutathione S-transferase M1 polymorphism and metabolism of sulforaphane from standard and high-glucosinolate broccoli. *The American journal of clinical nutrition*, 82(6), 1283-1291.
- Gerschman. (1981). Historical Introduction to the "Free Radical Theory" of Oxygen Toxicity. In D. L. G. Ph.D. (Ed.), *Oxygen and Living Processes-An Interdisciplinary Approach* (Vol. Part I, pp. 44-46): Springer New York.
- Gerschman, R., Gilbert, D. L., Nye, S. W., & Fenn, W. O. (1954). Influence of x-irradiation on oxygen poisoning in mice. *Proc Soc Exp Biol Med*, 86(1), 27-29. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13177582>
- Gloire, G., Legrand-Poels, S., & Piette, J. (2006). NF- κ B activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochemical pharmacology*, 72(11), 1493-1505.
- Grossman, E., Messerli, F. H., Boyko, V., & Goldbourt, U. (2002). Is there an association between hypertension and cancer mortality? *The American journal of medicine*, 112(6), 479-486.
- Guo, G., Morrissey, J., McCracken, R., Tolley, T., Liapis, H., & Klahr, S. (2001). Contributions of angiotensin II and tumor necrosis factor- α to the development of renal fibrosis. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 280(5), F777-F785.
- Ha, H., Yu, M. R., Choi, Y. J., Kitamura, M., & Lee, H. B. (2002). Role of high glucose-induced nuclear factor-kappaB activation in monocyte chemoattractant protein-1 expression by

- mesangial cells. *J Am Soc Nephrol*, 13(4), 894-902.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*: Oxford University Press, USA.
- Haouzi, D., Lekéhal, M., Moreau, A., Moulis, C., Feldmann, G., Robin, M. A., . . . Pessayre, D. (2000). Cytochrome P450-generated reactive metabolites cause mitochondrial permeability transition, caspase activation, and apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology*, 32(2), 303-311.
- Hartmann, C., Schulz, I., Epe, B., & Schupp, N. (2019). Angiotensin II-induced hypertension increases the mutant frequency in rat kidney. *Archives of toxicology*, 93(7), 2045-2055.
- Heidemann, C., Du, Y., & Scheidt-Nave, C. (2011). Diabetes mellitus in Deutschland.
- Heiss, E., Herhaus, C., Klimo, K., Bartsch, H., & Gerhäuser, C. (2001). Nuclear factor κ B is a molecular target for sulforaphane-mediated anti-inflammatory mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 276(34), 32008-32015.
- Hybertson, B. M., Gao, B., Bose, S. K., & McCord, J. M. (2011). Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. *Molecular aspects of medicine*, 32(4), 234-246.
- Kandhare, A. D., Mukherjee, A., & Bodhankar, S. L. (2017). Antioxidant for treatment of diabetic nephropathy: A systematic review and meta-analysis. *Chemico-biological interactions*, 278, 212-221.
- Kang, K. W. (2011). Angiotensin II-mediated Nrf2 down-regulation: a potential causing factor for renal fibrosis? *Archives of pharmacal research*, 34(5), 695-697.

- Kang, S. J., You, A., & Kwak, M.-K. (2011). Suppression of Nrf2 signaling by angiotensin II in murine renal epithelial cells. *Archives of pharmacal research*, 34(5), 829-836.
- Kang, Y.-M., Ma, Y., Zheng, J.-P., Elks, C., Sriramula, S., Yang, Z.-M., & Francis, J. (2009). Brain nuclear factor-kappa B activation contributes to neurohumoral excitation in angiotensin II-induced hypertension. *Cardiovascular research*, cvp073.
- Karin, M. (2006). Nuclear factor- κ B in cancer development and progression. *Nature*, 441(7092), 431-436.
- Karin, M., & Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annual review of immunology*, 18(1), 621-663.
- Karin, M., & Dhar, D. (2016). Liver carcinogenesis: from naughty chemicals to soothing fat and the surprising role of NRF2. *Carcinogenesis*, 37(6), 541-546.
- Karmakar, S., Weinberg, M., Banik, N., Patel, S., & Ray, S. (2006). Activation of multiple molecular mechanisms for apoptosis in human malignant glioblastoma T98G and U87MG cells treated with sulforaphane. *Neuroscience*, 141(3), 1265-1280.
- Kaschina, E., & Unger, T. (2003). Angiotensin AT1/AT2 receptors: Regulation, signalling and function. *Blood Pressure*, 12(2), 70-88. doi:Doi 10.1080/08037050310001057
- Kearney, P. M., Whelton, M., Reynolds, K., Muntner, P., Whelton, P. K., & He, J. (2005). Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *The Lancet*, 365(9455), 217-223.
- Kobayashi, M., & Yamamoto, M. (2005). Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway

- of antioxidant gene regulation. *Antioxidants & redox signaling*, 7(3-4), 385-394.
- Kwak, M.-K., Itoh, K., Yamamoto, M., & Kensler, T. W. (2002). Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter. *Molecular and cellular biology*, 22(9), 2883-2892.
- Kwak, M.-K., Wakabayashi, N., Itoh, K., Motohashi, H., Yamamoto, M., & Kensler, T. W. (2003). Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway Identification of novel gene clusters for cell survival. *Journal of Biological Chemistry*, 278(10), 8135-8145.
- Landmesser, U., Cai, H., Dikalov, S., McCann, L., Hwang, J., Jo, H., . . . Harrison, D. G. (2002). Role of p47 phox in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II. *Hypertension*, 40(4), 511-515.
- Larsson, S., & Wolk, A. (2011). Diabetes mellitus and incidence of kidney cancer: a meta-analysis of cohort studies. *Diabetologia*, 54(5), 1013-1018.
- Lawes, C. M., Vander Hoorn, S., & Rodgers, A. (2008). Global burden of blood-pressure-related disease, 2001. *The Lancet*, 371(9623), 1513-1518.
- Li, H., Wang, F., Zhang, L., Cao, Y., Liu, W., Hao, J., . . . Duan, H. (2011). Modulation of Nrf2 expression alters high glucose-induced oxidative stress and antioxidant gene expression in mouse mesangial cells. *Cell Signal*, 23(10), 1625-1632. doi:10.1016/j.cellsig.2011.05.016
- Li, M., Kim, D. H., Tsenovoy, P. L., Peterson, S. J., Rezzani, R., Rodella, L. F., . . . Abraham, N. G. (2008). Treatment of obese diabetic mice with a

- heme oxygenase inducer reduces visceral and subcutaneous adiposity, increases adiponectin levels, and improves insulin sensitivity and glucose tolerance. *Diabetes*, 57(6), 1526-1535.
- Li, W., Khor, T. O., Xu, C., Shen, G., Jeong, W.-S., Yu, S., & Kong, A.-N. (2008). Activation of Nrf2-antioxidant signaling attenuates NFκB-inflammatory response and elicits apoptosis. *Biochemical pharmacology*, 76(11), 1485-1489.
- Lindblad, Chow, W., Chan, J., Bergström, A., Wolk, A., Gridley, G., . . . Adami, H. (1999). The role of diabetes mellitus in the aetiology of renal cell cancer. *Diabetologia*, 42(1), 107-112.
- Lindblad, U., Boström, K. B., Torén, K., & Lissner, L. PURE-studien-sociala determinanter för kardiovaskulär sjukdom i staden och på landsbygden. Application.
- MacKenzie, S. M., Fraser, R., Connell, J. M., & Davies, E. (2002). Local renin-angiotensin systems and their interactions with extra-adrenal corticosteroid production. *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 3(4), 214-221.
- Mahéo, K., Morel, F., Langouët, S., Kramer, H., Le Ferrec, E., Ketterer, B., & Guillouzo, A. (1997). Inhibition of cytochromes P-450 and induction of glutathione S-transferases by sulforaphane in primary human and rat hepatocytes. *Cancer research*, 57(17), 3649-3652.
- Mahfoud, F., Böhm, M., Bongarth, C., Bosch, R., Schmieder, R., Schunkert, H., . . . Weil, J. (2019). Kommentar zu den Leitlinien (2018) der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) und der Europäischen Gesellschaft für Hypertonie (ESH) für das Management der arteriellen Hypertonie. *Der Kardiologe*, 13(1), 17-23.

- Mandel, P. (2015). Entstehung von oxidativen Stressmarkern in DNA und RNA nach der Behandlung mit den Hormonen Angiotensin II und Aldosteron in vitro und in vivo: Vergleich von drei Analysemethoden zum Nachweis von 8-Oxo-2'-desoxyguanosin in LLC-PK1-Zellen.
- Mani, M., Khaghani, S., Mohammadi, T. G., Zamani, Z., Azadmanesh, K., Meshkani, R., . . . Mostafavi, E. (2013). Activation of Nrf2-antioxidant response element mediated glutamate cysteine ligase expression in hepatoma cell line by homocysteine. *Hepatitis Monthly*, 13(5).
- Mattson, M. P., & Camandola, S. (2001). NF- κ B in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *The Journal of clinical investigation*, 107(3), 247-254.
- Matusheski, N. V., & Jeffery, E. H. (2001). Comparison of the bioactivity of two glucoraphanin hydrolysis products found in broccoli, sulforaphane and sulforaphane nitrile. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(12), 5743-5749.
- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1968). The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 243(21), 5753-5760.
- McCord, J. M., Keele, B. B., & Fridovich, I. (1971). An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(5), 1024-1027.
- McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M., & Hayes, J. D. (2003). Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 278(24), 21592-21600.

- McWalter, G. K., Higgins, L. G., McLellan, L. I., Henderson, C. J., Song, L., Thornalley, P. J., . . . Hayes, J. D. (2004). Transcription factor Nrf2 is essential for induction of NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1, glutathione S-transferases, and glutamate cysteine ligase by broccoli seeds and isothiocyanates. *The Journal of nutrition*, *134*(12), 3499S-3506S.
- Meyer, B. (2012). Kernweite H2AX-Phosphorylierung nach Schwerionenbestrahlung.
- Mezzano, S. A., Ruiz-Ortega, M., & Egido, J. (2001). Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension*, *38*(3), 635-638.
- Montezano, A. C., & Touyz, R. M. (2012). Oxidative stress, Noxs, and hypertension: experimental evidence and clinical controversies. *Annals of medicine*, *44*(S1), S2-S16.
- Myzak, M. C., Dashwood, W. M., Orner, G. A., Ho, E., & Dashwood, R. H. (2006). Sulforaphane inhibits histone deacetylase in vivo and suppresses tumorigenesis in Apcmin mice. *The FASEB journal*, *20*(3), 506-508.
- Myzak, M. C., Karplus, P. A., Chung, F.-L., & Dashwood, R. H. (2004). A novel mechanism of chemoprotection by sulforaphane inhibition of histone deacetylase. *Cancer research*, *64*(16), 5767-5774.
- Naugler, W. E., & Karin, M. (2008). NF- κ B and cancer—identifying targets and mechanisms. *Current opinion in genetics & development*, *18*(1), 19-26.
- Neuhauser, H., Kuhnert, R., & Born, S. (2017). 12-Month prevalence of hypertension in Germany.
- Nogueira, G. B., Punaro, G. R., Oliveira, C. S., Maciel, F. R., Fernandes, T. O., Lima, D. Y., . . . Higa, E. M. (2018). N-acetylcysteine protects against diabetic nephropathy through control of oxidative

- and nitrosative stress by recovery of nitric oxide in rats. *Nitric Oxide*, 78, 22-31.
- Parving, H.-H., Hommel, E., Mathiesen, E., Skøtt, P., Edsberg, B., Bahnse, M., . . . Lauritzen, E. (1988). Prevalence of microalbuminuria, arterial hypertension, retinopathy, and neuropathy in patients with insulin dependent diabetes. *British medical journal (Clinical research ed.)*, 296(6616), 156.
- Pergola, P. E., Raskin, P., Toto, R. D., Meyer, C. J., Huff, J. W., Grossman, E. B., . . . Christ-Schmidt, H. (2011). Bardoxolone methyl and kidney function in CKD with type 2 diabetes. *New England Journal of Medicine*, 365(4), 327-336.
- Pueyo, M. E., Gonzalez, W., Nicoletti, A., Savoie, F., Arnal, J.-F., & Michel, J.-B. (2000). Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor- κ B activation induced by intracellular oxidative stress. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20(3), 645-651.
- Queisser, N., Fazeli, G., & Schupp, N. (2010). Superoxide anion and hydrogen peroxide-induced signaling and damage in angiotensin II and aldosterone action. *Biological chemistry*, 391(11), 1265-1279.
- Queisser, N., & Schupp, N. (2012). Aldosterone, oxidative stress, and NF- κ B activation in hypertension-related cardiovascular and renal diseases. *Free Radic Biol Med*, 53(2), 314-327. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.011
- Renart, J., Reiser, J., & Stark, G. R. (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen

- structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(7), 3116-3120.
- Richmond, A. (2002). NF- κ B, chemokine gene transcription and tumour growth. *Nature Reviews Immunology*, 2(9), 664-674.
- Ruhee, R. T., Ma, S., & Suzuki, K. (2020). Protective effects of sulforaphane on exercise-induced organ damage via inducing antioxidant defense responses. *Antioxidants*, 9(2), 136.
- Scelo, G., Purdue, M. P., Brown, K. M., Johansson, M., Wang, Z., Eckel-Passow, J. E., . . . Foll, M. (2017). Genome-wide association study identifies multiple risk loci for renal cell carcinoma. *Nature communications*, 8(1), 1-9.
- Schmieder, R., & Bretzel, R. (2015). Hypertonie und Diabetes. *Der Diabetologe*, 11(5), 371-372.
- Schulz, A., Jankowski, J., Zidek, W., & Jankowski, V. (2014). Absolute quantification of endogenous angiotensin II levels in human plasma using ESI-LC-MS/MS. *Clinical proteomics*, 11(1), 1-9.
- Shah, A., & Channon, K. (2004). Free radicals and redox signalling in cardiovascular disease. *Heart*, 90(5), 486-487.
- Siems, W. (2005). *Oxidativer Stress und Pharmaka* (Vol. 15): Govi-Verlag Eschborn.
- Singh, A. V., Xiao, D., Lew, K. L., Dhir, R., & Singh, S. V. (2004). Sulforaphane induces caspase-mediated apoptosis in cultured PC-3 human prostate cancer cells and retards growth of PC-3 xenografts in vivo. *Carcinogenesis*, 25(1), 83-90.
- Siragy, H. M. (2000). AT1 and AT2 receptors in the kidney: role in disease and treatment. *American journal of kidney diseases*, 36(3), S4-S9.
- Siragy, H. M. (2004). *AT1 and AT2 receptor in the kidney: role in health and disease*. Paper presented at the Seminars in nephrology.

- Solis, W. A., Dalton, T. P., Dieter, M. Z., Freshwater, S., Harrer, J. M., He, L., . . . Nebert, D. W. (2002). Glutamate–cysteine ligase modifier subunit: mouse Gclm gene structure and regulation by agents that cause oxidative stress. *Biochemical pharmacology*, 63(9), 1739-1754.
- Sonnenlicht, U. (2008). Oxidativer Stress und Möglichkeiten seiner Messung aus umweltmedizinischer Sicht.
- Steinbrecher, A., & Linseisen, J. (2009). Dietary intake of individual glucosinolates in participants of the EPIC-Heidelberg cohort study. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 54(2), 87-96.
- Stern, M. P., & Haffner, S. M. (1986). Body fat distribution and hyperinsulinemia as risk factors for diabetes and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis: An Official Journal of the American Heart Association, Inc.*, 6(2), 123-130.
- Stocks, T., Van Hemelrijck, M., Manjer, J., Bjorge, T., Ulmer, H., Hallmans, G., . . . Stattin, P. (2012). Blood pressure and risk of cancer incidence and mortality in the Metabolic Syndrome and Cancer Project. *Hypertension*, 59(4), 802-810. doi:10.1161/hypertensionaha.111.189258
- Surh, Y.-J., & Na, H.-K. (2008). NF-κB and Nrf2 as prime molecular targets for chemoprevention and cytoprotection with anti-inflammatory and antioxidant phytochemicals. *Genes & nutrition*, 2(4), 313-317.
- Taillé, C., El-Benna, J., Lanone, S., Dang, M.-C., Ogier-Denis, E., Aubier, M., & Boczkowski, J. (2004). Induction of heme oxygenase-1 inhibits NAD (P) H oxidase activity by down-regulating cytochrome b558 expression via the reduction of heme availability. *Journal of Biological Chemistry*, 279(27), 28681-28688.

- Takenaka, H., Kihara, Y., Iwanaga, Y., Onozawa, Y., Toyokuni, S., & Kita, T. (2006). Angiotensin II, oxidative stress, and extracellular matrix degradation during transition to LV failure in rats with hypertension. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 41(6), 989-997.
- Thejass, P., & Kuttan, G. (2006). Antimetastatic activity of sulforaphane. *Life Sciences*, 78(26), 3043-3050.
- Thomas, L., & Messinger, M. (1993). Pathobiochemie und Labordiagnostik der Entzündung. *LABORATORIUMS MEDIZIN*, 17, 179-179.
- Traka, M. H., Melchini, A., & Mithen, R. F. (2014). Sulforaphane and prostate cancer interception. *Drug discovery today*, 19(9), 1488-1492.
- Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, 160(1), 1-40.
- Wang, X.-J., Sun, Z., Villeneuve, N. F., Zhang, S., Zhao, F., Li, Y., . . . Wondrak, G. T. (2008). Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis*, 29(6), 1235-1243.
- Ward, I. M., & Chen, J. (2001). Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *Journal of Biological Chemistry*, 276(51), 47759-47762.
- Whelton, P. K., Carey, R. M., Aronow, W. S., Casey, D. E., Collins, K. J., Himmelfarb, C. D., . . . Jones, D. W. (2018). 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA guideline for the prevention, detection, evaluation, and management of high blood pressure in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart

- Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Journal of the American College of Cardiology*, 71(19), e127-e248.
- Williams, B., Mancia, G., Spiering, W., Agabiti Rosei, E., Azizi, M., Burnier, M., . . . Dominiczak, A. (2018). 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Hypertension (ESH). *European heart journal*, 39(33), 3021-3104.
- Xu, C.-X., Zhu, H.-H., & Zhu, Y.-M. (2014). Diabetes and cancer: Associations, mechanisms, and implications for medical practice. *World J Diabetes*, 5(3), 372-380.
- Yoxall, V., Kentish, P., Coldham, N., Kuhnert, N., Sauer, M. J., & Ioannides, C. (2005). Modulation of hepatic cytochromes P450 and phase II enzymes by dietary doses of sulforaphane in rats: Implications for its chemopreventive activity. *International journal of cancer*, 117(3), 356-362.
- Zalba, G., José, G. S., Moreno, M. U., Fortuño, A., & Díez, J. (2005). NADPH oxidase-mediated oxidative stress: genetic studies of the p22phox gene in hypertension. *Antioxidants & redox signaling*, 7(9-10), 1327-1336.
- Zhang, D. D. (2006). Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway*. *Drug metabolism reviews*, 38(4), 769-789.
- Zhang, K., Cho, Posner, Talalay,. (1994). Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(8), 3147-3150.
- Zhang, Y., Li, J., & Tang, L. (2005). Cancer-preventive isothiocyanates: dichotomous modulators of

- oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 38(1), 70-77.
- Zhou, B., Bentham, J., Di Cesare, M., Bixby, H., Danaei, G., Cowan, M. J., . . . Bennett, J. E. (2017). Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19· 1 million participants. *The Lancet*, 389(10064), 37-55.
- Zhou, B., Perel, P., Mensah, G. A., & Ezzati, M. (2021). Global epidemiology, health burden and effective interventions for elevated blood pressure and hypertension. *Nature Reviews Cardiology*, 1-18.
- Ziech, D., Franco, R., Pappa, A., & Panayiotidis, M. I. (2011). Reactive Oxygen Species (ROS)—Induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 711(1), 167-173.

Appendix

I Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
A	Angiotensin II
ARE	Antioxidant-response-element
AT1R	Angiotensin-II-Typ1-Rezeptor
AT2R	Angiotensin-II-Typ2-Rezeptor
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	zyklisches Adeninmonosphosphat
c-Fos, c-Jun	Transkriptionsfaktoren im Zellkern.
DAG	Diacylglycerol
DABO	1,4-Diazabicyclo(2, 2,2)octen
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR:	epidermal growth factor-Rezeptor
ERK	Extrazellulär signalregulierende Kinase;
EtOH	Ethanol
FBS	Fetales Kälberserum
γH2AX	Phosphoryliertes Histon H2AX
γGCSc	γGlutamylcystein Synthetase schwere Untereinheit
HO-1	Hämoxygenase-1
H2O2	Wasserstoffperoxid

HCl	Salzsäure
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HG	High Glucose
HRP	Meerrettichperoxidase
HMP	High melting Point
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
IgG	Immunglobulin G
IKK	IKB-Kinase
IP3	Inositoltriphosphat
Keap 1	Kelch-like ECH-associated protein
l	Liter
LMP	Low-Melting-Point
LG	Low Glucose
M	Mol/l
MAPK	Mitogen-activated Proteinkinase
MeOH	Methanol
MEK	Mitogen-aktivierte Kinase
MLKK;	Myosin-Leichte-Ketten-Kinase
μM	Micromolar
pM	Picomolar
NaF	Natriumfluorid
NaI	Natriumiodid
NF-κB	nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells
nM	Nanomolar
Nrf 2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NaOH	Natriumhydroxid
NO	Stickstoffmonoxid

NQO1	NADPH: chinon-Oxidoreduktase-1
8-OxodG	8-Oxo-7, 8-dihydroguanin
O ₂	Sauerstoff
$\cdot\text{O}_2^-$	Superoxid
$\cdot\text{OH}$	Hydroxylradikal
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PKC	Proteinkinase C
PLA2	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D;
PVDF	Polyvinylfluorid
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Rpm	Rounds per minute
S	Sulphoraphan
SOD	Superoxiddismutase
SDS	Natriumlaurylsulfat
STAT	signal transducers and activators of transcription;
TBS-T	Tris-gepufferte Saline-Tween
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
ZnSO ₄	Zinksulfat

II **Abbildungsverzeichnis**

<i>Abbildung 1: Schematische Darstellung der intrazellulären Signaltransduktion nach Aktivierung des AT1-Rezeptors. Rot dargestellt in dieser Arbeit wichtige Zwischen- und Endprodukte. Modifiziert nach (Siragy 2004).</i>	<i>11</i>
<i>Abbildung 2: Stark vereinfachte Darstellung der Funktion der Transkriptionsfaktoren Nrf 2 und NF-κB in der Zelle bei oxidativem Stress. Genaue Beschreibung folgt im Text. Modifiziert nach Young-Joon Surh und Hye-Kyung Na (Surh and Na 2008).</i>	<i>24</i>
<i>Abbildung 3: Schematische Darstellung möglicher Vernetzung (Feedbackmechanismus) von Nrf 2 und NF-κB. Angelehnt an die in Cancers 2010 publizierte Graphik (Bellezza, Mierla et al. 2010)</i>	<i>28</i>
<i>Abbildung 4: Schematische Darstellung der Umwandlung von Glucoraphanin durch Hydrolyse in Sulforaphan. Rot gekennzeichnet die funktionelle Gruppe der Isothiocyanate.</i>	<i>31</i>
<i>Abbildung 5: Zusammenfassung der bisher erforschten molekularen Wirkmechanismen von Sulforaphan.</i>	<i>34</i>
<i>Abbildung 6: Beispielhafte Mikroskop Aufnahme einer Comet Assay Analyse, bei welcher die geschädigte DNA aus dem Zellkern wandert und sich als Kometenschweif</i>	

<i>darstellt. Die gelben Striche markieren den Kopf des Kometen. Der rote Strich zeigt das Ende des Kometenschweifs.</i>	<i>59</i>
<i>Abbildung 7: Bild zeigt die Bandenfärbung bei Nrf 2 mit unterschiedlicher Chemolumineszenz auf dem Film. Die erste markante Färbung ist der Marker.</i>	<i>66</i>
<i>Abbildung 8: Bild ist eine Kopie nach Färbung der Membran mit Ponceau S zur Kontrolle.</i>	<i>66</i>
<i>Abbildung 9: Repräsentativer Western Blot zur Expression von SOD bei LLC PK1-Zellen nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II zu verschiedenen Zeitpunkten.</i>	<i>66</i>
<i>Abbildung 10 Beispielhafte fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der LLC-PK1 Zellen nach Durchführung einer Zellfärbung. Links zeigt eine Kontrollfärbung mit DAPI. Rechts stellt eine Aufnahme einer Nrf 2-Färbung mit cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper dar.</i>	<i>70</i>
<i>Abbildung 11: Nachweis von DNA-Schäden mittels Comet Assay in LLC PK1-Zellen nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II für 30 Minuten, 2 Stunden, 4 Stunden und über 24 Stunden in vitro.</i>	<i>73</i>
<i>Abbildung 12: Nachweis von DNA-Schäden via γH2AX-Färbung nach Inkubation der LLC PK1-Zellen mit 200 nM Angiotensin II in vitro über einen Zeitraum von 30</i>	

Minuten, 2 Stunden, 4 Stunden und 24 Stunden. Als Negativkontrolle diente eine Behandlung der Zellen mit PBS für 2 Stunden.....76

Abbildung 13 Bilder einer γ H2AX-Immunfluoreszenzfärbung der LLC PK1-Zellen. Dargestellt sind jeweils repräsentative Bilder zu den in vitro Untersuchung der LLC PK1-Zellen zu jeweils unterschiedlichen Zeitpunkten nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II. PBS diente als Negativkontrolle.76

Abbildung 14: Darstellung der Veränderung des Nrf 2-Level in LLC-PK1-Zellen nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II über verschiedene Zeiträume via Nrf 2 Zellfärbung: 30 Minuten, 2 Stunden, 4 Stunden und 24 Stunden. Als Negativkontrolle diente eine Behandlung der Zellen mit PBS für 2 Stunden.....78

Abbildung 15: Bilder einer Nrf 2 -Zellfärbung der LLC PK1-Zellen. Dargestellt sind jeweils repräsentative Bilder zu den in vitro Untersuchung der LLC PK1-Zellen zu jeweils unterschiedlichen Zeitpunkten nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II. PBS diente als Negativkontrolle.....79

Abbildung 16: Auswirkung auf die NF- κ B-Menge in den LLC-PK1 Zellen nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II über verschiedene Zeiträume dargestellt

<p>via Zellfärbung auf NF-κB: 30 Minuten, 2 Stunden, 4 Stunden und 24 Stunden. Als Negativkontrolle diente eine Behandlung der Zellen mit PBS für 2 Stunden.....</p> <p>Abbildung 17 Bilder einer NF-κB -Zellfärbung der LLC PK1-Zellen. Dargestellt sind jeweils repräsentative Bilder zu den <i>in vitro</i> Untersuchung der LLC PK1-Zellen zu jeweils unterschiedlichen Zeitpunkten nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II. PBS diente als Negativkontrolle.....</p>	80
<p>Abbildung 18: Nachweis von DNA-Schäden mittels Comet Assay in LLC PK1-Zellen nach 2 Stunden Behandlung mit Angiotensin II in Kombination mit unterschiedlichen Sulforaphankonzentrationen (2 μM, 5 μM, 10 μM und 20 μM) <i>in vitro</i>. Als Negativkontrolle diente eine Behandlung der Zellen mit PBS für 2 Stunden.....</p>	82
<p>Abbildung 19: Nachweis von DNA-Schäden mittels Comet Assay in LLC PK1-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten (30 Minuten, 2 Stunden, 4 Stunden und 24 Stunden) nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II allein, mit 5 μM Sulforaphan und in Kombination von 200 nM Angiotensin II und 5 μM Sulforaphan <i>in vitro</i>. Als Negativkontrolle diente eine Behandlung der Zellen mit PBS für 2 Stunden.....</p>	84
	86

Abbildung 20: Bilder einer γ H2AX-Immunfluoreszenzfärbung der LLC PK1-Zellen. Dargestellt sind jeweils repräsentative Bilder zu den in-vitro-Untersuchung der LLC PK1-Zellen bei 4 Stunden nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II, 5 μ M Sulforaphan und kombiniert mit Angiotensin II und Sulforaphan. PBS diente als Negativkontrolle.....86

Abbildung 21: Nachweis von DNA-Schäden mittels Comet Assay bei LLC PK1-Zellen nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid in verschiedenen Konzentrationen und in Kombination mit 5 μ M Sulforaphan in vitro. Als Negativkontrolle diente eine Behandlung der Zellen mit PBS für 2 Stunden.....89

Abbildung 22: Auswirkung einer Behandlung mit 5 μ M Sulforaphan auf das Nrf 2-Level in LLC PK1-Zellen mittels Nrf 2-Zellfärbung über die Zeiträume 30 Minuten, 2 Stunden, 4 Stunden und 24 Stunden. Als Kontrollgruppe diente PBS.91

Abbildung 23: Nachweis der Veränderung des Nrf 2-Leves in LLC PK1-Zellen mittel Nrf 2 Zellfärbung nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II und der Kombination 200 nM Angiotensin II mit 5 μ M Sulforaphan zu folgenden Zeiträumen: 30 Minuten, 2 Stunden, 4

<i>Stunden und 24 Stunden. Als Kontrollgruppe diente PBS.</i>	92
<i>Abbildung 24: Bilder einer Nrf 2-Zellfärbung der LLC PK1-Zellen. Dargestellt sind jeweils repräsentative Bilder zu den in-vitro- Untersuchung der LLC PK1-Zellen nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II, 5 µM Sulforaphan und kombiniert mit Angiotensin II und Sulforaphan zu verschiedenen Zeiten.</i>	94
<i>Abbildung 25: Modulation der NF-κB-Menge/Zelle in LLC-PK1 Zellen nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II, 5 µM Sulforaphan und kombiniert mit 200 nM Angiotensin II und 5 µM Sulforaphan über verschiedene Zeiträume (30 Minuten, 2 Stunden, 4 Stunden und 24 Stunden) mittels NF-κB-Zellfärbung . Als Kontrollgruppe diente PBS.</i>	96
<i>Abbildung 26: Bilder einer NF-κB-Zellfärbung der LLC PK1-Zellen. Dargestellt sind jeweils repräsentative Bilder zu den in-vitro- Untersuchung der LLC PK1-Zellen nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II in direktem Vergleich zur Behandlung mit 5 µM Sulforaphan zu verschiedenen Zeiten.</i>	98
<i>Abbildung 27: Western Blot: A: Exemplarische Darstellung zur Expression von SOD und dem Referenzprotein α Tubulin in den LLC-PK1 Zellen zu</i>	

verschiedenen Behandlungszeitpunkten nach Behandlung mit A=Angiotensin II und S= Sulforaphan B: Analyse zur Expression von SOD und dem Referenzprotein α -Tubulin bei LLC PK1-Zellen nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II oder 5 μ M Sulforaphan über 2, 4, 24 und 48 Stunden. Als Kontrollgruppe diente PBS bei 2 Stunden.....100

Abbildung 28: Western Blot: A: Exemplarische Darstellung zur Expression der γ -Glutamylcysteinsynthase und dem Referenzprotein α Tubulin in den LLC-PK1 Zellen zu verschiedenen Behandlungszeitpunkten nach Behandlung mit A=Angiotensin II und S= Sulforaphan; B: Analyse der Werte zur γ -Glutamylcysteinsynthase -Menge in LLC PK1-Zellen nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II, 5 μ M Sulforaphan über 2, 4, 24 und 48 Stunden. Als Kontrollgruppe diente PBS bei 2 Stunden.....103

Abbildung 29: γ H2AX-Menge/Zelle in LLC PK1-Zellen mit hoher (4g/l) und niedriger (1g/l) Glucosekonzentration nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II, 5 μ M Sulforaphan und kombiniert mit 200 nM Angiotensin II und 5 μ M Sulforaphan über 4 Stunden in der γ H2AX Zellfärbung . Als Kontrollgruppe diente PBS.....107

Abbildung 30: Bilder einer γ H2AX -Zellfärbung der LLC PK1-Zellen. Dargestellt sind jeweils repräsentative Bilder zu den in-vitro- Untersuchung der LLC PK1-Zellen nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II, 5 μ M Sulforaphan und in Kombination mit 200 nM Angiotensin und 5 μ M Sulforaphan nach einem 4h Behandlungszeitraum und mit unterschiedlicher Glucosekonzentration.....108

Abbildung 31: Bilder einer Nrf 2 -Zellfärbung der LLC PK1-Zellen. Dargestellt sind jeweils repräsentative Bilder zu den in-vitro- Untersuchung der LLC PK1-Zellen nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II, 5 μ M Sulforaphan und in Kombination mit 200 nM Angiotensin und 5 μ M Sulforaphan nach einem 4h Behandlungszeitraum und mit unterschiedlicher Glucosekonzentration.....112

Abbildung 32: Auswertung der Nrf 2 Zellfärbung: Nrf 2-Menge/Zelle in LLC PK1-Zellen mit hoher (4g Glucose /L Medium) und niedriger (1g Glucose/L Medium) Glucosekonzentration nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II, 5 μ M Sulforaphan und kombiniert mit 200 nM Angiotensin II und 5 μ M Sulforaphan über 4 Stunden. Als Kontrollgruppe diente PBS.110

Abbildung 33: Auswertung der NF κ B-Zellfärbung: NF κ B-Menge/Zelle in LLC PK1-Zellen mit hoher und niedriger Glucosekonzentration nach Behandlung mit 200 nM

Angiotensin II, 5 μ M Sulforaphan und kombiniert mit 200 nM Angiotensin II und 5 μ M Sulforaphan über 4 Stunden. Als Kontrollgruppe diente PBS..... 113

Abbildung 34: Bilder einer NF κ B-Zellfärbung der LLC PK1-Zellen. Dargestellt sind jeweils repräsentative Bilder zu den in-vitro- Untersuchung der LLC PK1-Zellen nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II, 5 μ M Sulforaphan und in Kombination mit 200 nM Angiotensin und 5 μ M Sulforaphan nach einem 4h Behandlungszeitraum und mit unterschiedlicher Glucosekonzentration..... 114

III Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Hersteller</i>	<i>38</i>
<i>Tabelle 2: Antikörper mit den zugehörigen Epitopen, Verwendungen und Herstellern.....</i>	<i>41</i>
<i>Tabelle 3: Material beziehungsweise Geräte, deren Verwendungszweck und Hersteller.....</i>	<i>44</i>
<i>Tabelle 4: Puffer und Lösungen und deren zugehörige Methode mit Inhaltsstoffen</i>	<i>52</i>

IV Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Frau PD Dr. Nicole Schupp und Frau Prof. Dr. Helga Stopper bedanken, die es mir nicht nur ermöglichten, meine Dissertation am Institut für Toxikologie der Universität Würzburg machen zu dürfen, sondern mich mit viel Anregung und Geduld begleitet haben.

Ein großer Dank geht auch an die Arbeitsgruppe AG Schupp und an Dr. Susanne Brandt für die großartige Zusammenarbeit und die Unterstützung.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere meinem Freund Tom bedanken für die Unterstützung bei den Korrekturen und vor allem für die die stete Motivation.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat. Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Bonn, den 30.05.2022

Arietta Lucia Lotz