

Anja Hüger  
Dr. med

## **Interaktion und Wirkung von Cytokinen auf das Apoptose- und Proliferationsverhalten von Mesangialzellen.**

Geboren am 20.09.1972 in Neckarsulm  
Reifeprüfung am 21.05.1992 in Neckarbischofsheim  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1993 bis SS 2000  
Physikum am 28.03.1995 an der Universität Heidelberg  
Klinisches Studium in Heidelberg  
Praktisches Jahr in Heidelberg  
Staatsexamen am 20.11.2000 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Kinderheilkunde  
Doktorvater: Prof. Dr. med. O. Mehls

Glomeruläre Erkrankungen, die durch progressive Glomerulosklerose charakterisiert sind, zeigen eine gesteigerte mesangiale Zellproliferation und Expansion extrazellulärer Matrix. Als wesentlicher Regulationsmechanismus mesangialer Hyperproliferation konnte Apoptose, programmierter Zelltod nachgewiesen werden. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluß verschiedener Faktoren wie Entzug von Wachstumsfaktoren, Hemmung der Proteinsynthese durch Cycloheximid und die Wirkung der Cytokine IGF-I, IGF-II und TGF- $\beta$  auf Apoptose und Proliferation von Mesangialzellen zu untersuchen. Es sollte weiter untersucht werden, in welchem Ausmaß Cytokine die lokale IGF-I-Produktion stimulieren.

Die Untersuchungen wurden in-vitro an Primärkulturen von Mesangialzellen durchgeführt, die sowohl von 100g schweren Sprague Dawley Ratten, als auch aus Rindenregionen humaner Nieren (nach Nephrektomie) isoliert wurden. Die spezifische Apoptose wurde durch Propidiumiodid-Färbung und anschließende Messung in der Durchflußzytometrie bestimmt, die Proliferation durch Zellzählung. Der Nachweis der IGF-I-Produktion erfolgte mit Hilfe eines Radioimmunoassays.

Durch den Entzug von Wachstumsfaktoren und die Inkubation mit Cycloheximid konnte Apoptose bei humanen und bei Rattenmesangialzellen induziert werden. Die Proliferation der humanen Mesangialzellen, nicht jedoch der Rattenmesangialzellen, konnte durch den Entzug von Wachstumsfaktoren und der Behandlung mit Cycloheximid reduziert werden.

IGF-I führte konzentrationsabhängig zu einer Reduktion der spezifischen Apoptose (-28% nach 12h) und einer Steigerung der Proliferation (+22% nach 12h). Eine maximale Wirkung von IGF-I wurde bei einer Konzentration von  $10^{-7}$ M erreicht. Dieser Effekt konnte sowohl bei Ratten-, als auch bei humanen Mesangialzellen beobachtet werden.

Durch IGF-II konnte keine Reduktion der Apoptose und keinen Einfluß auf die Proliferation erzielt werden.

Die Koinkubation mit IGF-I und IGF-II führte wahrscheinlich infolge kompetitiver Hemmung am IGF-I-Rezeptor zu einer relativen Reduktion der Apoptose gegenüber der Wirkung von IGF-I allein und zu keiner additiven Beeinflussung der Proliferation.

TGF- $\beta$  in einer Konzentration von  $10^{-9}$ M führte lediglich nach 12-stündiger Inkubation zu einer leichten Reduktion der Apoptoserate, sowohl bei humanen (-13%), als auch bei Rattenmesangialzellen (-26%). TGF- $\beta$  hatte keine Auswirkung auf die Zellproliferation.

Die Koinkubation mit TGF- $\beta$  ( $10^{-9}$ M) und IGF-II ( $10^{-7}$ M) führte zu keiner Reduktion der spezifischen Apoptose humaner Mesangialzellen. Die Proliferation hingegen konnte stimuliert werden. Der Anstieg der Zellzahl scheint demnach vorwiegend durch Matrixsynthese bedingt zu sein.

Erstmals konnte ein synergistischer Effekt von TGF- $\beta$  und IGF-I auf die Apoptose humaner Mesangialzellen beobachtet werden. Die spezifische Apoptose konnte signifikant reduziert (-57% nach 12h), die Proliferation signifikant gesteigert werden (+55% nach 12h). Die Untersuchung bei Rattenmesangialzellen zeigte vergleichbare Effekte (Apoptose: -32%, Proliferation: +68% nach 12h). Sie deuten auf eine synergistische Interaktion von TGF- $\beta$  und IGF-I hin.

Kultivierte Mesangialzellen exprimieren den Rezeptor für IGF-I und sind in der Lage, lokal IGF-I zu synthetisieren und zu sezernieren. Die lokale IGF-I-Produktion, gemessen als Konzentration im Überstand der Zellkultur, konnte durch IGF-I in der maximal wirksamen Konzentration von  $10^{-7}$ M deutlich gesteigert werden (+8000% nach 24h). Dieser Effekt konnte durch die Koinkubation mit TGF- $\beta$  ( $10^{-9}$ M) signifikant erhöht werden (+13600% nach 24h).

Aus den vorliegenden Untersuchungen kann geschlossen werden, daß insbesondere IGF-I und TGF- $\beta$  Apoptose und Proliferation von kultivierten humanen und Rattenmesangialzellen modulieren. Da gleichzeitig die lokale Produktion von IGF-I gesteigert wird, erscheint es möglich, daß die lokale IGF-I-Produktion ein wichtiges Bindeglied für die Wirkung der Cytokine darstellt. Die Ergebnisse eröffnen gedankliche Möglichkeiten, glomeruläre Erkrankungen durch Steuerung der Apoptose mit Hilfe von Cytokinen therapeutisch zu beeinflussen.