



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Fakultät für Klinische Medizin Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

Über die Regulation von Endothelin-1 und Transforming Growth Factor- β 1 in kultivierten humanen proximalen Tubulusepithelzellen

Autor: Emmanuel Konstantin Chorianopoulos
Einrichtung: V. Medizinische Klinik
Doktorvater: Prof. Dr. F. J. van der Woude

Die Entwicklung einer interstitiellen Fibrose hat große prognostische Bedeutung im Hinblick auf die Entstehung chronischer Niereninsuffizienz. Dabei scheinen die beiden Mediatoren Endothelin und Transforming-Growth-Factor β 1 (TGF- β 1) eine wichtige Rolle zu spielen. Wir untersuchten deshalb die Regulation dieser Moleküle in kultivierten humanen proximalen Tubulusepithelzellen (HPTEC) unter Bedingungen, die die Entstehung interstitieller Fibrose fördern sollen, oder solchen, denen ein schützender Einfluß nachgesagt wird.

Weder Cyclosporin A, noch hohe Glucose-Konzentrationen oder Angiotensin II hatte einen Einfluß auf die Produktion von Endothelin in HPTEC. Cyclosporin A und Glucose hatte ebenso wenig Einfluß auf die TGF- β -Synthese, jedoch wurde unter Angiotensin II bei unveränderter Protein-Sekretion eine vermehrte mRNA-Produktion an TGF- β 1 beobachtet. Einzig Albumin war unter den von uns getesteten Stimuli in der Lage die Produktion (bei TGF- β in 3 von 8 getesteten Zelllinien) und die Transkription beider Cytokine zu erhöhen. Da Albumin auch unter physiologischen Glucose-Konzentrationen teilweise glykosyliert ist und die Menge an glykosylierten Molekülen, auch als Advanced Glycation End Products (AGE) bezeichnet, gleichzeitig auch prognostisch ungünstig hinsichtlich der Entwicklung chronischer Niereninsuffizienz ist, wurde die Wirkung von β -Amyloid, eines Liganden des Rezeptors für Advanced Glycation End Products (RAGE) untersucht. β -Amyloid stimulierte die Endothelin-Synthese, wohingegen die TGF- β -Synthese unbeeinflusst blieb. Verglichen wurde weiterhin die Wirkung von verstärkt glykosyliertem Albumin mit der von Standard-Albumin. In-vitro glykosyliertes Albumin zeigte keine erhöhte stimulatorische Potenz für Endothelin verglichen mit herkömmlichem Albumin. Desweiteren zeigte die Hemmung der Transkription für RAGE keinen Einfluß auf die Wirkung von Albumin und β -Amyloid.

Heparin hatte sowohl auf Endothelin als auch TGF- β inhibitorische Wirkung. Der Grad der Sulphatierung spielte dabei eine wichtige Rolle, wobei N-sulphatierte Heparine stärker wirkten. Auch zeigten die N-desulphatierten Heparinoide mit geringem Rest-Sulphat-Gehalt inhibitorische Wirkung auf die TGF- β -Synthese während die Endothelin-Produktion unter N-desulphatierten Heparinoiden unverändert blieb. Bindungsexperimente für Endothelin und TGF- β zeigten, daß Heparin beide Mediatoren zu binden vermag. Von Bedeutung bei der beobachteten Bindung beider Moleküle war der Grad der Sulphatierung. TGF- β wurde ausschließlich von den N-sulphatierten Glykosaminoglykanen gebunden, Endothelin-1 auch von N-desulphatierten mit hohem Sulphat-Restgehalt. Die Ergebnisse der Bindungsstudie korrelierten also nur teilweise mit der inhibitorischen Wirkung. Eine Hemmung der Sulphatierung am 6-O-Atom der endogen produzierten Proteoglykanen durch Chlorat zeigte ebenfalls eine inhibitorische Wirkung auf die Endothelin-Produktion, während die TGF- β -Synthese unverändert blieb.

Es ist bekannt, daß Inhibitoren des Angiotensin-Converting-Enzyms nephroprotektiv wirken. Für verschiedene Zelltypen ist eine Verknüpfung zwischen dem Endothelin- und dem Renin-Angiotensin II-Aldosteron-System (RAAS) beschrieben worden. Die Experimente zum RAAS zeigten allerdings keinen Einfluß auf die Produktion von Endothelin und TGF- β 1 in HPTEC. Im Falle des TGF- β konnte jedoch eine Erhöhung der mRNA-Synthese unter Angiotensin II festgestellt werden. Die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse zum RAAS bestätigen die in der Literatur postulierte Zellspezifität in der Regulation des Endothelin-Systems.

Das Ausmaß der Proteinurie steht in Korrelation zur Schwere der interstitiellen Fibrose. Die gewonnenen Ergebnisse zeigen, daß Albumin die Bildung zweier für die Entstehung interstitieller Fibrose wichtiger Mediatoren stimuliert. Das Ausmaß der Glykosylierung des Albumins alleine scheint

dabei keine Rolle zu spielen, obwohl β -Amyloid als Ligand des Rezeptors für Advanced Glycation End Products die Endothelin-Synthese stimulierte. Der stimulatorischen Wirkung von β -Amyloid könnte deshalb vielleicht ein anderer Mechanismus als die Bindung an RAGE zu Grunde liegen. Unterstützend hierfür zeigen die Experimente, bei denen die Transkription des RAGE-Genes gehemmt wurde, auch keine Wirkung auf die Albumin- und β -Amyloid-stimulierte Endothelin-Sekretion. Folglich ist ein anderer Mechanismus als die Stimulation von RAGE für den beobachteten Albumin-Effekt wahrscheinlich.

Heparine besitzen eine lange bekannte nephroprotektive Wirkung. Die gezeigte inhibitorische Wirkung auf die Endothelin- und TGF- β -Synthese könnte einer dieser Beobachtung zu Grunde liegenden Mechanismen sein. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, daß Endothelin und TGF- β 1 an Heparin binden. Sowohl für die Inhibition, als auch für die Bindung war das Sulphatierungsmuster von Bedeutung, wobei speziell die Sulphatierung am N-Atom wichtig war.

Die Inhibition der Endothelin- und TGF- β -Synthese durch Heparine erscheint sowohl hinsichtlich der Pathogenese interstitieller Fibrose, als auch im Hinblick auf ein therapeutisches Vorgehen von Bedeutung.