

Aus dem Institut für Physiologie der Universität Tübingen

Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. F. Lang

Abteilung Physiologie I

Abteilungsleiter: Professor Dr. F. Lang

**Die Glukose-abhängige
Regulation der Genexpression der humanen
Serin/Threonin Kinase h-sgk.**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Martina Lanzendörfer

aus

Bietigheim

2002

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lang

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. S. Waldegger

in liebevoller Erinnerung
an
H. Schmidtchen

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Endotheliale Dysfunktion bei Diabetes mellitus	2
1.2 Auswirkung der Hyperglykämie auf das Zellvolumen	18
1.3 Die zellvolumenregulierte Kinase h-sgk	24
1.4 Fragestellung	30
2. Material und Methoden	31
2.1 Allgemeine Materialien	31
2.2 Methoden	34
3. Ergebnisse	49
3.1 Übersicht der Ergebnisse	49
3.2 Ergebnisse der Northern Blot Hybridisierungen	51
3.3 Analyse der basalen und der stimulierten Promotoraktivität eines h-sgk Promotorkonstrukts	67
4. Diskussion der Ergebnisse	71
4.1 Mögliche Signaltransduktionswege und Stimuli der h-sgk Genexpression	71
4.2 Promotorkonstrukt	81
4.3 Schlußfolgerung und klinischer Ausblick	82
5. Diskussion der Methoden	85
5.1 Northern Blots	85
5.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)	87
5.3 Reportergenanalyse mittels des Dual Luziferase-Essay-Systems	87
6. Zusammenfassung	89
7. Literaturverzeichnis	91
8. Danksagungen	111
9. Lebenslauf	113

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

Der Verlauf der diabetischen Erkrankung und die Sterblichkeit an Diabetes mellitus werden hauptsächlich durch die vaskulären Spätkomplikationen – Makroangiopathie und Mikroangiopathie – bestimmt. Die spezifischen Kennzeichen der Mikroangiopathie sind Retinopathie und Nephropathie, welche mit Erblindung und Nierenversagen als ihre äußerste Konsequenz einhergehen (Stehouwer et al., 1997).

Gemeinsam ist diesen Spätkomplikationen ein Verlust der intakten Endothelfunktion, die essentiell zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase ist.

Das intakte Endothel ist hierbei in der Lage, den Gefäßtonus und die Gefäßdurchlässigkeit zu regulieren und ebenso das Gleichgewicht zwischen Gerinnung und Fibrinolyse aufrechtzuerhalten. Zu den Aufgaben des ungeschädigten Endotheliums gehören des weiteren die Bildung von subendothelialer Matrix, Extravasation von Leukozyten und die Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen und renalen Mesangiumzellen. Um diese verschiedenen Aufgaben erfüllen zu können, bildet das Endothelium Bestandteile der extrazellulären Matrix und eine Vielzahl an regulatorischen Mediatoren, wie NO (Vane et al., 1990), Prostanoiden, Endothelin, Angiotensin II, gewebspezifischen Plasminogenaktivator (t-PA), Plasminogenaktivator-inhibitor-1 (PAI-1), von Willebrand Faktor (vWF), Adhäsionsmoleküle und Zytokine. Das intakte Endothel vermindert normalerweise den Gefäßtonus, bei diesem Vorgang spielt Stickoxid eine entscheidende Rolle (Vane et al., 1990). Es reguliert die Gefäßdurchlässigkeit für Nährstoffe, Hormone, Leukozyten und andere Makromoleküle (Pober et al., 1990). Außerdem hemmen Endothelzellen die Thrombozytenadhäsion und Aggregation, indem sie Prostazykline und NO freisetzen. Das Endothelium limitiert die Aktivität der Gerinnungskaskade durch Wechselwirkungen mit Thrombomodulin-Protein C und Heparansulphat-Antithrombin III (Hamsten, A., 1995). Das Endothelium ist befähigt, sich an zeitliche und lokale Anforderungen anzupassen. Beispiele hierfür sind die Freisetzung von NO und t-PA nach Stimulation und die Induktion der

Genexpression, nach Exposition gegenüber entzündlichen Mediatoren (Vane et al., 1990). Wird nun das empfindliche Gleichgewicht zwischen dilatierenden und kontrahierenden Faktoren, zwischen gerinnungshemmenden und gerinnungsfördernden Mediatoren und zwischen wachstumshemmenden und wachstumsfördernden Substanzen gestört, dann spricht man von endothelialer Dysfunktion.

1.1 Endotheliale Dysfunktion bei Diabetes mellitus

Die Dysfunktion des Endotheliums äußert sich in:

- vermehrter Durchlässigkeit für Makromoleküle (Schmidt et al., 1996; Stehouwer et al., 1995)
- verminderte Produktion von Vasodilatoren wie NO (Komers et al., 1994, Elliott et al., 1993)
- vermehrte Synthese von Vasokonstriktoren (Vane et al., 1990)
- vermehrte Synthese an prothrombotischen Substanzen (Stehouwer et al., 1995)
- verminderte gerinnungshemmende Aktivität (Stehouwer et al., 1992)
- vermehrte Permeabilität für Leukozyten, Zunahme von entzündlichen Reaktionen (Lambert et al., 1996)
- veränderte extrazelluläre Matrixsynthese (Cagliero et al., 1991)

Die Balance zwischen gerinnungshemmenden und gerinnungsfördernden Faktoren ist beim diabetischen Patienten mit endothelialer Dysfunktion in vielfältiger Weise beeinträchtigt, zum Beispiel ist ein Anstieg des vom Endothelium gebildeten von-Willebrand Faktors assoziiert mit endothelialer Zellschädigung (Ford et al., 1991).

An der Pathogenese der endothelialen Dysfunktion spielen folgende Faktoren eine wesentliche Rolle:

1. Hyperglykämie (King et al., 1994)

2. Fortgeschrittene Glykosylierungsendprodukte (AGE) (Brownlee et al., 1994; Bierhaus et al., 1997; Schmidt et al., 1994)
3. Veränderung der Signaltransduktion durch:
 - erhöhte Aktivierung der Proteinkinase C (Sowers et al., 1995; King et al., 1994)
 - verminderte Expression von inhibitorischen G-Proteinen (Derubertis et al., 1994)
 - verminderter Phosphoinositolmetabolismus (King et al., 1994)
4. Erhöhte Inaktivierung von NO durch hohe Spiegel an freien Radikalen, AGE und erhöhte Transportbarrieren, wie verdickte Basalmembranen (Sowers et al., 1995; Bierhaus et al., 1998; Brownlee et al., 1994)
5. Bildung und Freisetzung von vasoaktiven Prostanoiden, die der Wirkung von NO entgegensteuern (Derubertis et al., 1994)
6. Oxidativer Streß (Baynes et al., 1999; Giugliano et al., 1996; Lyons et al., 1997)

Den Punkten 1-3 kommt bezüglich des Zusammenhangs zwischen Erhöhung des Blutglukosespiegels und der Pathogenese der diabetischen Spätfolgen besondere Bedeutung zu, weswegen sie im folgenden ausführlich erörtert werden.

Hyperglykämie:

Hyperglykämie ist eine der wichtigsten Ursachen der endothelialen Dysfunktion, wobei jedoch der Mechanismus der schädlichen Wirkung der Hyperglykämie noch nicht vollständig in allen Details aufgeklärt ist. Derzeit existieren mehrere Theorien, die eine Verbindung zwischen Mechanismus und Wirkung des erhöhten Blutzuckerspiegels herstellen (King et al., 1994).

An diesen Mechanismen sind beteiligt: der Aldose-Reduktase-Polyol-Weg, nichtenzymatische Glykosylierung von Proteinen, Veränderungen des intrazellulären Redoxpotentials und Veränderungen des Diacylglycerol-Proteinkinase C Signaltransduktionsweges.

Des Weiteren führen erhöhte Spiegel an Glukose zur vermehrten Bildung von Kollagen Typ 4, von Fibronectin und erhöhen die Aktivität von Enzymen, die an der Kollagensynthese beteiligt sind. Dies führt zu einer Veränderung der endothelialen Zellmatrixsynthese, woraus eine Verdickung der Basalmembran resultiert (Cagliero et al., 1991).

Die Sorbitol-Polyol Theorie basiert auf der Entdeckung, daß Glukose intrazellulär durch die Aldosereduktase zu Sorbit reduziert wird (Hohman et al., 1994). Da Sorbit die Zellmembran nicht permeieren kann, kommt es zum Anstieg der intrazellulären Sorbitkonzentration und durch die osmotische Wirksamkeit von Sorbit zur Zellschwellung. Beim Diabetiker führen erhöhte Blutzuckerspiegel zu erhöhtem intrazellulären Sorbitolspiegel, indem die Aktivität der Aldosereduktase und der Sorbitol-Dehydrogenase gesteigert wird (Hohman et al., 1994). In bestimmten Geweben führt die erhöhte Sorbitolkonzentration zu Störungen der Organfunktion. So fördert Sorbitol die Entwicklung von Katarakten beim Diabetiker, indem die Anhäufung von Sorbit in der Augenlinse zur Einlagerung von Wasser führt, was die Transparenz der Linse beträchtlich vermindert. Von den schädlichen Wirkungen des erhöhten Sorbitolspiegels sind ebenfalls Schwann'sche Zellen und Neurone betroffen. Des Weiteren beeinträchtigt die Anhäufung von Sorbitol die Nervenleitungsgeschwindigkeit, Reflexe und Sensibilität, was die Entstehung der diabetischen Polyneuropathie fördert. Weitere Mechanismen, über die Sorbitol zur Zellschädigung und zu diabetischen Spätkomplikationen führen sind:

Der erhöhte Substratfluß über den Polyolweg führt zur Verminderung des Verhältnisses von NADPH zu NADP^+ und erhöht die zytosolische NADH/NAD^+ ratio (Williamson et al., 1993). Die Entleerung der zellulären NADPH-Speicher durch die Aldosereduktase kann auch die Aktivität anderer NADPH-abhängiger Enzyme beeinflussen (Giugliano et al., 1996). Die Biosynthese von NO (Stickstoffoxid) ist ebenfalls durch die verringerte Konzentration von NADPH beeinträchtigt, daraus resultiert eine Verringerung der NO-Konzentration und somit auch eine Verminderung der Vasodilatation in Endothelzellen (Tomlinson et al., 1994). Der durch Hyperglykämie

induzierte Anstieg der NADH/NAD^+ ratio wird als Pseudohypoxie bezeichnet (Williamson et al., 1993) und spielt eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der diabetischen Spät komplikationen. Dieser Gedanke beruht auf der Gemeinsamkeit, die zwischen den metabolischen Folgen der Pseudohypoxie und der echten Hypoxie besteht. Beide, Hypoxie und Pseudohypoxie, bilden freie Radikale. Die Pseudohypoxie über eine verstärkte Synthese von Prostaglandin H_2 aus Prostaglandin G_2 , da das Enzym Hydroperoxidase NADH als Kofaktor benötigt (Smith et al., 1986). Die echte Hypoxie führt zur Bildung von freien Radikalen über ischämische Zustände und die nachfolgende Reperfusion (McCord et al., 1985).

Auch die Entleerung von Myoinositolspeichern steht in direktem Zusammenhang mit einem erhöhten Sorbitolspiegel und einem gesteigerten Umsatz über die Aldosereduktase (Tomlinson et al., 1994). Die Verminderung des Myoinositols schränkt den Umsatz von Phosphoinositiden ein, deren primäre Aufgabe darin besteht, second messenger wie Inositolphosphate und Diacylglycerol zu produzieren. Diese Botenstoffe sind verantwortlich für die Modulation intrazellulären Calciums und für die Aktivierung der Ca^{2+} -abhängigen Proteinkinase C. Deshalb hat die Entleerung der Myoinositolspeicher bei Diabetikern weitreichende Folgen, die die intrazellulären Signaltransduktionswege betreffen, möglicherweise kommt es dadurch auch zu Defekten der Na^+/K^+ -ATPase (Tomlinson et al., 1994).

Auch die Taurinspeicher werden durch die Akkumulation von Sorbitol entleert. Taurin ist ein bekannter Stimulus der neuronalen Na^+/K^+ ATPase (Hastings et al., 1985) und die Verminderung des Taurins steht in Zusammenhang mit Parästhesien, Schmerzen und Überleitungsblocks (Stevens et al., 1993) in durch Diabetes geschädigten Nerven.

Eine weitere wichtige Auswirkung des intrazellulären Sorbitolspiegels ist die Verminderung an reduziertem Glutathion (Tomlinson et al., 1994). Glutathion wirkt als Schutz gegen die Glykosylierung von Proteinen (AGE-Bildung) und wirkt gegen die Bildung von freien Radikalen (Jongkind, et al., 1989). Dies könnte ein weiteres Erklärungsmodell für die Pathogenese der diabetischen Spätfolgen sein.

Die direkte Gewebsschädigung, die durch einen erhöhten Sorbitolspiegel vermittelt wird, ist wahrscheinlich nicht auf die osmotische Wirkung des Sorbitols zurückzuführen, da die Sorbitolspiegel selbst in Organen, die am meisten geschädigt sind, z.B. die Augenlinse, eine Konzentration von 2 mmol/l nicht übersteigen. Sehr wahrscheinlich wird die gewebsschädigende Wirkung von Sorbitol dadurch vermittelt, daß es zu einer Hemmung der Aufnahme von Myoinositol kommt (Larkins et al., 1992; Greene et al., 1987;).

Fortgeschrittene Glykosylierungsprodukte

Proteine und Lipide, die reduzierenden Zuckern ausgesetzt sind, werden nichtenzymatisch glykosyliert und oxidiert. Dies führt zuerst zur Bildung von frühen Glykosylierungsprodukten, wie der Schiff'schen Base und den Amadori-Produkten (siehe Abbildung 1). Das bestbekannte dieser Produkte ist das HbA_{1c}, das für die Langzeitüberwachung des Blutzuckerspiegels bei Diabetikern als Parameter herangezogen wird. Die frühen Glykosylierungsprodukte befinden sich mit der Plasmaglukose im Gleichgewicht und wenn der Glukosespiegel fällt, dann können sich die frühen Glykosylierungsprodukte wieder in die ursprünglichen Proteine umwandeln.

Bei hohem Blutzuckerspiegel hingegen kommt es durch die Maillard Reaktion zu einer irreversiblen Umwandlung der frühen Glykosylierungsprodukte zu fortgeschrittenen Glykosylierungsprodukten (engl.: advanced glycation end products - AGE). Diese AGE finden sich in der Gefäßwand und in unterschiedlichen Geweben im Rahmen des physiologischen Alterungsprozesses. Zur starken Erhöhung von AGE kommt es bei Diabetes mellitus, bei welchem das Vorhandensein von AGE mit diabetischen Komplikationen, vor allem Mikroangiopathie assoziiert ist.

Einleitung

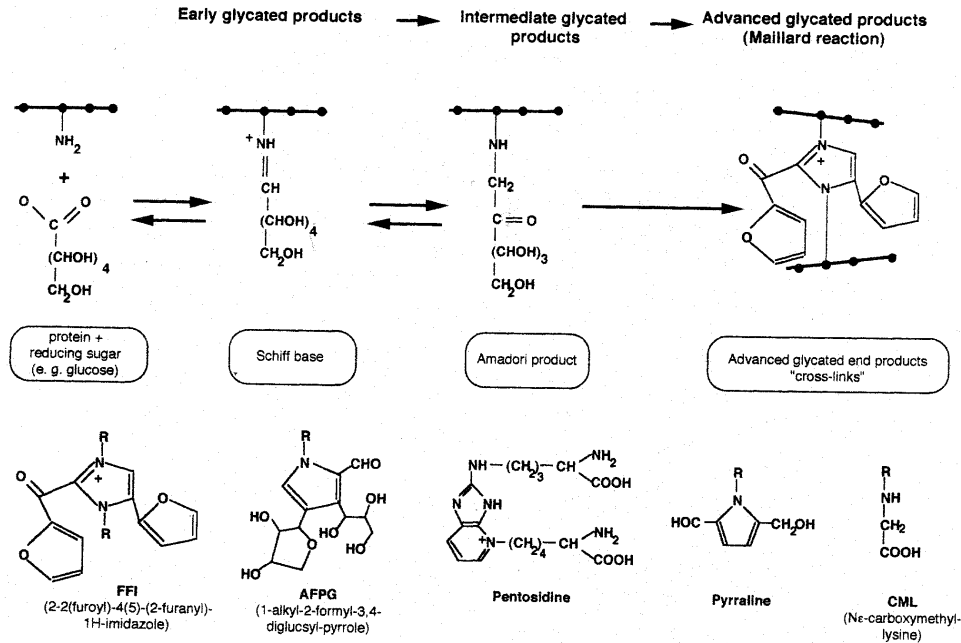


Abb. 1: Schema über die Bildung der fortgeschrittenen Glykosylierungsendprodukte (AGE) durch die Maillard-Reaktion: reduzierte Zucker kondensieren mit den Aminogruppen der Makromoleküle und bilden reversible Schiff'sche Basen. Intramolekulare Bindungen führen zu den chemisch stabilisierten Amadori-Produkten. Weitere Umlagerungen, Dehydrierungs- und Kondensationsreaktionen führen zu der Bildung von irreversiblen AGE.

Das untere Schema zeigt die Struktur der AGE. (Bierhaus et al., 1998)

Trotz aller Heterogenität innerhalb der großen Gruppe der fortgeschrittenen Glykosylierungsendprodukte, verbindet sie das Vorhandensein eines gemeinsamen Rezeptors. Dieser Oberflächenrezeptor, genannt RAGE, wird vor allem auf mononukleären Phagozyten, aber auch auf Endothelzellen, mesangialen Zellen, glatten Muskelzellen und Nervenzellen exprimiert (Schmidt et al., 1994).

Die Spätkomplikationen induzierende Wirkung der AGE wird hauptsächlich über drei Mechanismen erklärt:

1. AGE verändern Signaltransduktionswege (Bierhaus et al., 1998). Dazu gehört beispielsweise die Induktion der Synthese und Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die am Proteinumsatz und an der Zellreparatur beteiligt sind (Vlassara et al., 1995) aber auch an der Entwicklung von Gefäßschäden und diabetischen Komplikationen (Schmidt et al., 1995; Vlassara et al., 1994). Die Signaltransduktion über AGE-Rezeptoren führt zur Bildung von freien Sauerstoffradikalen, was wiederum oxidativen Streß induziert (Brownlee et al., 1993).
2. Über Bindung an spezifische AGE-Rezeptoren (RAGE) werden folgende AGE-Wirkungen vermittelt (Brownlee et al., 1993): Die Bindung von AGE an den Makrophagenrezeptor bewirkt die Produktion von Interleukin 1, Insulin-like growth factor 1 und Tumornekrosefaktor α . Diese Zytokine stimulieren die Proliferation von glomerulären Mesangiumzellen und glatten Muskelzellen der Gefäße (Kirstein et al., 1992). Durch Bindung von AGE an den spezifischen Rezeptor endothelialer Zellen wird die Aktivität von Thrombomodulin an der Oberfläche des Endotheliums reduziert (Esposito et al., 1992). Dadurch wird wiederum die Aktivierung des Protein C-Weges verhindert, der der Gerinnung entgegenwirkt. Des weiteren bewirkt die endotheliale Rezeptorbindung von AGE einen Anstieg der Konzentration von Endothelin-1, was eine verstärkte Vasokonstriktion nach sich zieht (Brownlee et al., 1994).
3. AGE führen zur Induktion von oxidativem Streß (Schmidt et al., 1994). Proteine, die nichtenzymatisch glykosyliert wurden, können reaktive freie Radikale bilden (Mullarkey et al., 1990). Dies könnte eine mögliche Erklärung für die Fähigkeit von AGE sein, die Bildung von NO im Endothelium zu unterdrücken (Hogan et al., 1992).

Einleitung

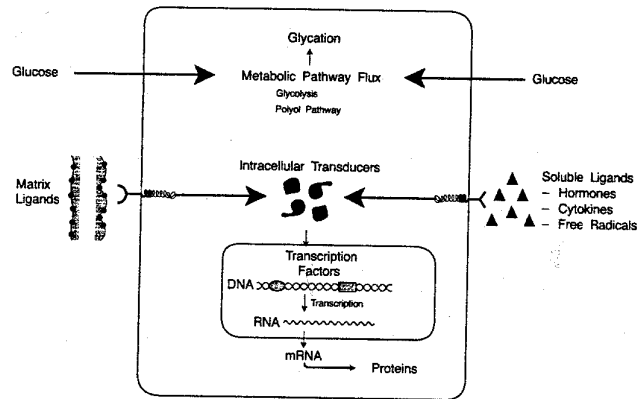


Abb. 2: Die schematische Zelle zeigt drei grundlegende Mechanismen, über die AGE möglicherweise pathologische Veränderungen bei Diabetikern verursachen (Brownlee et al., 1994)

Einer der wichtigsten Mechanismen, durch welchen AGE zu diabetischen Spätkomplikationen führt, ist die Strukturveränderung der extrazellulären Matrix (Brownlee, et al., 1994). Die Bildung von fortgeschrittenen Glykosylierungsendprodukten führt zu Änderungen von wichtigen Matrixbestandteilen.

Diese betreffen Kollagen Typ 4 und Typ 1 und führen hierbei zum Beispiel zu Veränderungen der Kollagenzusammensetzung, der intramolekularen Bindungsfähigkeit, etc.. Ebenso wird die Funktion des adhäsiven Matrixmoleküls Vitronectin durch AGE Bildung beeinträchtigt. Bei Diabetikern wird auch eine verringerte Bindung von Heparansulfatproteoglykan an die diabetische Basalmembran beobachtet (Klein et al., 1989). Dieser Verlust an Matrix gebundenem Heparansulfat wird verantwortlich gemacht für die Stimulation einer kompensatorischen Überproduktion an anderen Matrixkomponenten in der Gefäßwand (Ruoslahti et al., 1991).

Die AGE Bildung an der extrazellulären Matrix resultiert in verminderter Elastizität, vermehrter Dicke, Rigidity und dadurch bedingter Einengung des Gefäßlumens (Bierhaus et al., 1998). Diese Matrix-AGE führen zu Defekten in der Gefäßantwort auf

Stimuli, indem sie NO inaktivieren. Gleichzeitig induzieren AGE die Expression des potenten Vasokonstriktors Endothelin-1 und verändern den Gefäßtonus in Richtung Vasokonstriktion.

Die Bindung von AGE an mononukleäre Phagozyten führt zur Induktion von Platelet-derived growth factor, Insulin-like growth factor und entzündungsfördernden Zytokinen, wie Interleukin-1 und Tumornekrosefaktor. Der Konzentrationsanstieg von diesen induzierten Zytokinen stimuliert die Proliferation von glomerulären Mesangiumzellen, vaskulären glatten Muskelzellen und erhöht die glomeruläre Synthese von Kollagen Typ IV.

Die Bindung von AGE an den endothelialen Rezeptor induziert gerinnungsfördernde Veränderungen des Endothels, was zum Teil durch Änderungen der Thrombomodulin-Aktivität und durch Anstieg der Gewebefaktoren bestimmt werden können.

Zusätzlich zu diesen gerinnungsfördernden Wirkungen, wird durch Bindung von AGE an den endothelialen Rezeptor Endothelin-1 vermehrt gebildet.

Die Folgen dieser AGE Wirkungen äußern sich als fokale Thrombose und Vasokonstriktion.

Außerdem führt die Bindung von AGE an den endothelialen Rezeptor zu oxidativem Streß über die Bildung von freien Sauerstoffradikalen. Dieser oxidative Streß führt möglicherweise zur Veränderung der endothelialen Genexpression und ist eine mögliche Erklärung für die Fähigkeit von AGE, die Freisetzung von NO zu unterbinden.

Der oxidative Streß führt unter anderem zur vermehrten Transkription von Faktor NF-kappa-B (Yan et al., 1994), dem eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Atherosklerose zukommt, da NF-kappa-B die Transkription von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen induziert.

Dafür spricht auch, daß die Expression von VCAM-1, einem vaskulären Zelladhäsionsmolekül, durch Bindung von AGE an den endothelialen Rezeptor erhöht

wird. Die Expression von VCAM-1 ist eines der frühesten Ereignisse, die bei der Atherosklerose beobachtet werden kann (Schmidt et al., 1994).

Veränderungen der zellulären Signaltransduktion

Die Proteinkinase C hat Anteil an wichtigen zellulären Antworten auf eine Vielzahl von Agonisten, einschließlich Hormonen, Neurotransmittern und Wachstumsfaktoren.

Unter dem Begriff Proteinkinase C (PKC) faßt man eine aus mindestens 12 Mitgliedern bestehende Familie von Proteinkinasen zusammen. Diese in Struktur, intrazellulärer Lokalisation und Substratspezifität unterschiedlichen Serin/Threoninkinasen, lassen sich in drei Hauptgruppen unterteilen (Way et al., 2000):

1. Herkömmliche PKC (cPKC). Hierzu zählen die PKC Isoformen α , β_1 , β_2 und γ . Die cPKC ist calciumabhängig, wird durch Phosphatidylserin und den second messenger Diacylglycerol aktiviert.
2. Neue PKC (nPKC). Hierzu zählen die PKC Isoformen δ , ϵ , η , θ . Sie werden unabhängig von Calcium reguliert und über DAG und Phosphatidylserin aktiviert.
3. Atypische PKC (aPKC). Hierzu zählen die PKC Isoformen ζ und ι . Sie werden ebenfalls calciumunabhängig reguliert. Allerdings erfordern sie kein DAG zur Aktivierung, sondern ihre Aktivität wird über PS (Phosphatidylserin) reguliert (Hofmann et al., 1997; Kanashiro et al., 1998).

Nicht zu den drei Hauptklassen der PKC Isoformen zählt die μ PKC Isoform. Ihre Aktivität wird sowohl Calcium-, als auch PS-unabhängig reguliert. Aktiviert wird sie über Phorbolster (Mochly-Rosen, et al., 1998). Die PKC Isoformen unterscheiden sich in unterschiedlicher Gewebsspezifität, so ist die γ PKC spezifisch für das ZNS und Rückenmark, die θ PKC für hämatopoetische Zellen und Skelettmuskulatur und die β PKC für Pankreasinselzellen, Gehirn, Monozyten und Netzhaut (Way et al., 2000).

Innerhalb einer Zelle unterscheiden sich die PKC Isoformen in ihrer nach Aktivierung stattfindenden Translokation und in unterschiedlicher Spezifität zu Bindungsproteinen, sogenannten „Ankerproteinen“, die aktivierte, bzw. inaktivierte PKC Isoformen zu

unterschiedlichen Zellkompartimenten transportieren (Mochly-Rosen et al., 1998). Die unterschiedliche Spezifität zu Ankerproteinen und die die spezifische subzelluläre Lokalisation der einzelnen Isoformen könnte verbunden sein mit der zellulären Funktion der PKC Isoformen (Way et al., 2000). Die PKC Isoformen sind in eine N-terminale regulatorische und in eine C-terminale katalytische Einheit unterteilt. Bei den cPKC Isoformen interagieren die C1/C2 Einheiten mit Diacylglycerol, Phorbolestern, PS und Calcium. Die spezifischen Unterschiede der einzelnen Isoformen, repräsentieren sich vor allem innerhalb der katalytische Region (Way et al., 2000). Die katalytische Domäne enthält eine ATP-Bindungsregion, die große Unterschiede innerhalb der verschiedenen Mitglieder der PKC-Familie aufweist (Nishizuka et al. 1992).

Aktiviert wird die Kinase über erhöhte Spiegel an Diacylglycerol (DAG) in Zellmembranen, diese Spiegel rühren von der durch Agonisten (Phospholipase A₂ und Phospholipase D) induzierten Hydrolyse von Inositolphosphat (Nishizuka, 1992).

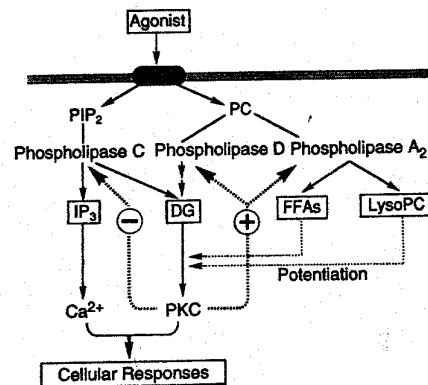


Abb. 3: Schematische Präsentation, der durch Agonisten-induzierten Degradierung von Membranphospholipiden, die zur anhaltenden Aktivierung der PKC führen (Nishizuka et al., 1992)

Phospholipase C vermittelte Aktivierung der Proteinkinase C:

Diacylglycerol kann über drei unterschiedliche Wege gebildet werden.

1. Rezeptorabhängig, wenn ein Agonist an den membranständigen Rezeptor bindet und daraufhin Phosphoinositoldiphosphat durch die Phospholipase C hydrolytisch gespalten wird. Diese DAG Bildung ist normalerweise zeitlich abhängig von der Bildung von Inositoltriphosphat (IP₃).
2. Rezeptorunabhängig. Es wird diskutiert, daß Hyperglykämie zur de novo Synthese von Diacylglycerol führt (Williamson et al., 1993).
3. Mit Sphingomyelin assoziierte Synthese im Golgi-Apparat (Nishizuka et al., 1992)

Aktivierung der PKC über Phospholipase D:

Verschiedene Ergebnisse deuten darauf hin, daß Phosphatidylcholin durch Phospholipase D in agonistischer Weise hydrolysiert wird, worauf es zur Bildung von Phosphatidsäure kommt, die anschließend durch die Phosphomonoesterase in Diacylglycerol umgewandelt wird.

Aktivierung der PKC über Phospholipase A₂:

Die Phospholipase A₂, die über Hydrolysierung von Phospholipiden zur Freisetzung von freien Fettsäuren und Lysophospholipiden führt, ist im menschlichen Organismus ubiquitär vorhanden.

Der Zusammenhang zwischen der Aktivierung der PKC über DAG und Phospholipase A₂ besteht darin, daß ungesättigte cis-konfigurierte Fettsäuren, einschließlich Linolsäure, Linolensäure und Arachidonsäure, welche alle durch Phospholipase A₂ aus Phospholipiden hydrolysiert werden, die DAG-abhängige Aktivierung der PKC verstärken.

Aktivierung der Proteinkinase C durch Calcium:

In den meisten stimulierten Zellen steigt die Konzentration intrazellulären Calciums nur vorübergehend an, während die daraus resultierenden physiologischen Antworten auch

Einleitung

noch dann persistieren, während die Calciumkonzentration längst wieder zu ihrem Ausgangswert zurückgekehrt ist (Nishizuka et al., 1992).

Es wird angenommen, daß die verlängerte Aktivierung der Proteinkinase C für die Aufrechterhaltung dieser zellulären Antworten verantwortlich ist.

Die Mobilisierung von intrazellulärem Calcium und Aktivierung der PKC agieren synergistisch, um eine Vielzahl an zellulären Antworten hervorzurufen. Mögliche biochemische Mechanismen für diesen Synergismus bestehen in direkter Beeinflussung des Calciumeinstroms in das Zellinnere durch die Proteinkinase C, indem die PKC zur Aktivierung von L-Typ Calciumkanälen führt (Kamp et al., 2000). Ein weiterer Mechanismus ist die Aktivierung der membranständigen Calciumpumpe durch die PKC (Cirillo et al., 1995). Außerdem kann es über Aktivierung der PKC zur Entleerung von intrazellulären Calciumspeichern kommen (Kamp et al., 2000).

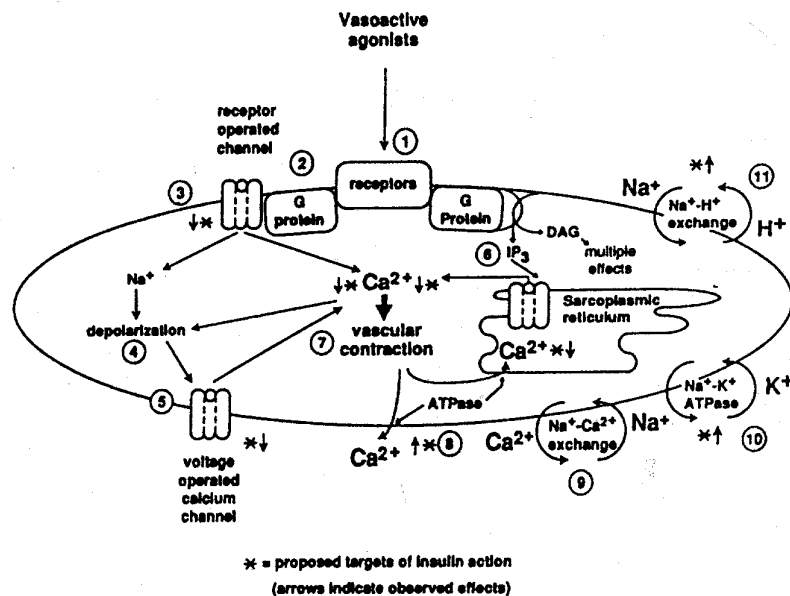


Abb.4: Schematische Darstellung der Mechanismen, die zur Regulation des intrazellulären Calciums in glatten Gefäßmuskelzellen beitragen (Levy et al., 1994)

Levy et al. postulierten 1994, daß Veränderungen in der intrazellulären Calciumhomöostase in direktem Zusammenhang mit diabetischen Spätkomplikationen, wie Mikroangiopathie stehen.

Bei Diabetikern wurden in verschiedenen Geweben, wie Niere (Levy et al., 1990), Arterien (Maser et al., 1991) abnorme intrazelluläre Calciumspiegel festgestellt.

Für Störungen des regulären Calciumstoffwechsels werden Veränderungen der Na^+/K^+ ATPase und der Ca^{2+} ATPase verantwortlich gemacht.

Beide ATPasen spielen bei der Aufrechterhaltung der intrazellulären Calciumhomöostase eine wichtige Rolle. Die membranständige Ca^{2+} ATPase, indem sie Ca^{2+} aus der Zelle befördert und die Na^+/K^+ ATPase, indem sie den Spiegel intrazellulären Natriums verändert und dadurch den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, der ebenfalls Ca^{2+} aus der Zelle befördert, moduliert.

So wurden bei Diabetikern verminderte Aktivitäten der Ca^{2+} -ATPase (Levy et al., 1989) und der Na^+/K^+ ATPase (Cohen et al., 1988) gefunden, was zu einem Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels führt.

Als Folgen der Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels resultieren:

- Beeinflussung grundlegender metabolischer Zellfunktionen durch Aktivierung von Calcium-abhängigen Proteinkinasen, Phosphatasen, Phospholipasen und lysosomaler Enzyme (Levy et al., 1994).

- Verdickung der Basalmembran:

Die Basalmembran ist eine spezielle Form der extrazellulären Matrix, bestehend aus Typ 4 Kollagen (Laminin, Fibronectin), und Proteoglykanen (Heparansulfat, Chondroitinsulfat). Ein Anstieg des intrazellulären Calciums führt zur selektiven Überexpression von Proteinen des rauhen endoplasmatischen Retikulums, dem Syntheseort der Plasmamembranproteine und trägt zu Veränderungen in der Zusammensetzung und Dicke der Basalmembran bei (Williamson et al., 1998). Des

weiteren führt ein Anstieg von intrazellulärem Calcium zur Verringerung der Degradierungsrate der Basalmembran oder kann den Effekt von Glukose bezüglich der Degradierung der Basalmembran verstärken. Lokale Erhöhungen des Calciumspiegels beeinträchtigen die Lamininfunktion (Charonis et al., 1990). Calcium erhöht die Aggregation und Bildung von Laminin-Nidogen Komplexen und vermindert die Empfänglichkeit von membranären Laminin für die proteolytische Verdauung. Schlußendlich führt die vermehrte Bindung von Calcium an Komponenten der Basalmembran zur Verringerung der membranären Integrität und zur Abschwächung der Degradierung der Basalmembran.

- Beeinflussung der Kapillaren:

Ein Anstieg des intrazellulären Calciums initiiert möglicherweise die Kontraktion von Kapillaren bei Diabetikern (Levy et al., 1994), da sich Calcium-regulierte Actin und Myosinfilamente im Endothelium befinden.

Wenn sich nun aneinandergrenzende Endothelzellen unabhängig voneinander kontrahieren, so führt dies zur Entstehung von Lücken im geschlossenen Endothelverband, woraus eine Änderung in der Permeabilität des Endothels resultiert (Levy et al., 1994).

Hyperglykämie und oxidativer Streß

Oxidativer Streß scheint eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der diabetischen Spätkomplikationen zu spielen. Diese Hypothese wird gestützt durch die Tatsache, daß viele biochemische Stoffwechselwege, die eng mit Hyperglykämie assoziiert sind, z.B. Glukose Autooxidation, Polyolweg und Proteinglykosylierung den Anstieg freier Radikale steigern können. Außerdem führt die Glukoseexposition von Endothelzellen zur vermehrten Bildung von Superoxidanionen, die wahrscheinlich die Bildung von NO unterbinden. Des weiteren können viele der durch eine hohe Glukosekonzentration

bedingten Beeinträchtigungen der Endothelfunktion durch Antioxidantien wieder aufgehoben werden (Giugliano et al., 1996).

Eine wesentliche Quelle von Sauerstoffradikalen sind Ein-Elektronenreduktionen, die z.B. durch Autooxidation entsprechender zellulärer Verbindungen entstehen und dann zum Superoxidradikal O_2^- führen. Zu Substanzen, die autooxidiert werden können, gehören unter anderem: Hämoglobin, Glutathion, Flavine und auch Glukose. Außerdem kann es zur Bildung von freien Radikalen über Zwei-Elektronenreduktionen, die zu Wasserstoffsuperoxid führen, kommen. Das besonders reaktive Hydroxylradikal OH^\cdot entsteht durch Drei-Elektronenreduktionen, die meist von Metallen katalysiert werden. Darüber hinaus gibt es eine Reihe organischer Sauerstoffradikale, die meist in Sekundärreaktionen entstehen. Die hierbei entstehenden sogenannten freien Radikale können biologische Strukturen in vielfacher Weise schädigen:

- an der DNA kann es durch Modifizierung der verschiedenen Basen oder der Desoxyribose zu Strangbrüchen, oxidativem Abbau der Basen oder Fehlpaarungen der Base kommen
- die Oxidation von Proteinen, vor allem an Thiolgruppen, führt zur Veränderung ihrer biologischen Aktivität
- unter den Kohlenhydraten werden durch oxidativen Streß vor allem Proteoglykane und Hyaluronsäure geschädigt, die oxidative Schädigung führt bei diesen Verbindungen zur Depolymerisierung
- die Auswirkung oxidativer Schäden auf Lipide ist besonders gut untersucht. Hier sind es speziell die mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die in einer Reihe von charakteristischen Reaktionen modifiziert werden, die als Lipidperoxidation bezeichnet werden.

Wie steht nun die Hyperglykämie in Verbindung zur vielfältigen Zellschädigung durch oxidativen Streß?

Hyperglykämie führt zur vermehrten Autooxidation von Glukose. Die hierbei entstehenden reduzierten Sauerstoffprodukte sind: O_2^- , $\cdot OH$ und H_2O_2 . Alle diese Produkte können Lipide, DNA, Proteine durch Fragmentierung und Quervernetzungen schädigen, dieser Prozeß wird autooxidative Glykosylierung genannt (Giugliano et al., 1996).

Erhöhte Glukosespiegel führen außerdem zum Anstieg von intrazellulären Fruktose- und Sorbitolspiegeln, was durch eine vermehrte Aktivität der Aldosereduktase und der Sorbitoldehydrogenase erklärt werden kann (Hohman et al., 1994). Vermehrter Substratumsatz über den Polyolweg vermindert auch die $NADPH/NADP^+$ ratio und erhöht die zytosolische $NADH/NAD$ ratio (Williamson et al., 1993). Die Verminderung der Konzentration von $NADPH$ betrifft viele $NADPH$ abhängige Stoffwechselwege und Enzyme, unter anderem auch Glutathion, dem eine Bedeutung als antioxidative Substanz zukommt und das durch die verminderte $NADPH/NADP^+$ ratio auch in geringerer Konzentration vorhanden ist, wodurch die Wirkung der freien Radikale nicht abgeschwächt werden kann (Kashiwagi et al., 1994).

Ebenso gibt es Anhaltspunkte, daß Hyperglykämie die natürliche antioxidative Abwehr einschränkt. Antioxidative Enzyme, wie Katalase und Glutathioperoxidase liegen bei diabetischen Tieren in verminderter Konzentration vor (Wohaieb, et al., 1987).

Neben diesen bereits erwähnten indirekten Wirkungen der Glukose auf Zellen, können erhöhte Glukosespiegel auch direkt intrazelluläre Geschehnisse über Änderungen der extrazellulären Tonizität beeinflussen.

1.2. Auswirkung der Hyperglykämie auf das Zellvolumen

Die Aufrechterhaltung eines konstanten Zellvolumens gehört zu den grundlegenden Voraussetzungen, die das Überleben von Zellen sichert. Um allzu große Schwankungen

des Zellvolumens zu verhindern, haben Zellen eine Vielzahl an zellvolumenregulatorischen Mechanismen entwickelt. Dazu gehören z.B. Aktivierung von Ionenkanälen oder der Transport von osmotisch aktiven Substanzen über die Zellmembran.

Rasche Änderungen der extrazellulären Osmolarität führen unmittelbar zu Änderungen des zellulären Volumens, was vom Ausmaß her sehr gut mit dem Grad der Osmolaritätsänderung korreliert. Jedoch nähert sich innerhalb kürzester Zeit, auch bei Fortbestehen der Osmolaritätsänderung, das Zellvolumen wieder annähernd dem Ausgangsvolumen an. Dies gilt gleichermaßen für die initiale Zellschwellung, nach Exposition gegenüber hypotonen Medien, als auch für die initiale Zellschrumpfung, nach Exposition gegenüber hypertonen Medien. Wirksam werden hierbei die Mechanismen der regulatorischen Volumenabnahme (RVD, regulatory volume decrease) und der regulatorischen Volumenzunahme (RVI, regulatory volume increase).

Bei der regulatorischen Volumenabnahme werden am häufigsten Kalium- und Anionenkanäle aktiviert. Diese Anionenkanäle sind nicht selektiv aktivierbar und sind sowohl am Transport von Chlorid und Bikarbonationen (Lang et al., 1995), als auch von neutralen Osmolyten und organischen Anionen beteiligt. Neben den Ionenkanälen beteiligen sich auch Transportproteine am RVD. Zellschwellung bewirkt hierbei die Aktivierung von KCl-Symportern, Anionenkanälen, durch die Cl^- , HCO_3^- und Osmolyte permeieren können, Osmolytikanälen und auch indirekt über Aktivierung von Ca^{2+} -Kanälen und K^+ -Kanälen.

Bei der regulatorischen Zunahme des Zellvolumens kommt es zum Einstrom anorganischer Ionen, was über eine Aktivierung des $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransporters (Geck et al., 1985) und des Na^+/H^+ Austauschers erreicht wird. Die Aktivierung des Na^+/H^+ Austauschers führt zur Alkalinisierung des Zellinneren, was wiederum die Aktivierung des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers nach sich zieht. Durch die parallele Aktivierung der beiden Austauschersysteme kommt es zu einem Nettotransport von NaCl nach intrazellulär, was als osmotisch aktive Substanz dazu beiträgt, daß Wasser, dem

Konzentrationsgradienten folgend, einströmen kann und somit das Zellvolumen wieder ansteigt (Lang et al., 1998).

Die Anhäufung von Elektrolyten nach Zellschrumpfung ist limitiert, da hohe Ionenkonzentrationen mit Makromolekülen, z.B. Proteinen, in Wechselwirkung treten und es dadurch zu Störungen deren Funktion kommen könnte. Um die beschriebenen Effekte zu umgehen, produzieren Zellen sogenannte Osmolyte. Darunter versteht man Moleküle, die einen osmotischen Gradienten erzeugen, ohne Funktion und Struktur von Makromolekülen zu beeinflussen.

Diese Osmolyte lassen sich in drei Gruppen gliedern:

1. Polyalkohole, (Sorbitol, Inositol)
2. Methylamine, (Glycerophosphorylcholine, Betain)
3. Aminosäuren und Aminosäurederivate

Die Anhäufung zellulärer Osmolyte kann durch Stimulierung deren Aufnahme in die Zelle, vermehrte Neubildung oder verminderte Degradierung erreicht werden. Zur Abnahme der Konzentration an Osmolyten kommt es durch zelluläre Freisetzung von Osmolyten oder Degradierung (Lang et al., 1998).

Intrazelluläre Signaltransduktionswege können durch Änderungen des Zellvolumens gesteuert werden. Hierzu gehört auch der Signaltransduktionsweg der p-38 Kinase, die zur großen Gruppe, der durch Mitogene aktivierten Kinasen gehört.

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) sind Serin-Threonin-Proteinkinasen, die in allen eukaryontischen Zellen exprimiert werden und durch verschiedenste Stimuli, von Zytokinen über Wachstumsfaktoren, Hormonen, Neurotransmittern bis zu zellulärem Streß, aktiviert werden können (Widmann et al., 1999).

Die Regulation dieser MAP-Kinasen wird über ein Modul, bestehend aus 3 Kinasen, gesteuert. Dieses 3-Kinasen-Modulmodell findet sich evolutionär hoch konserviert bei

allen MAP-Kinasen. Das erste Element des Moduls ist die MAP-Kinase-Kinase (MKKK), die selbst entweder durch die MAP-Kinase-Kinase-Kinase oder durch Interaktion mit einem GTP-bindenden Protein der ras oder rho-Familie, aktiviert wird. Die MKKK phosphoryliert das nächste Modulelement, die MKK. Diese wiederum kann das letzte Bindeglied des Moduls, die MAPK, aktivieren. MAPK ist somit die letzte Kinase im Modul und ist befähigt, Substrate an Serin/Threoninresten zu phosphorylieren. Mitogen-aktivierte Kinasen sind Prolin-gesteuert, d.h. sie phosphorylieren nur Substrate, die die Aminosäure Prolin in ihrer P₁-Bindungsstelle besitzen. Die Aktivierung der MAPK ist über eine zweifache Phosphorylierung, wobei sowohl Tyrosin, als auch Threonin phosphoryliert werden müssen, gesteuert. Jede MAPK-Subspezies besitzt eine spezifische Aktivierungssequenz, die als Aktivierungsschleife bezeichnet wird. Diese Sequenz besteht immer aus den Aminosäuren Threonin und Tyrosin, die dritte Aminosäure der Aktivierungsschleife ist subtypspezifisch (Thr-X-Tyr).

Die humanen MAP-Kinasen lassen sich in drei Hauptgruppen unterteilen: p-38 MAPK, JNK-MAPK und ERK-MAPK. Für diese Arbeit ist lediglich die p-38 MAPK von Bedeutung, da sie durch osmotischen Streß aktiviert werden kann.

Die p-38 MAPK lassen sich wiederum in vier Subspezies unterteilen, zu diesen gehören p38 α , p38 β , p38 γ und p38 δ . Alle diese Kinasen weisen hohe Sequenzhomologie mit der MAP-Kinase hog-1, die in Hefen vorkommt, auf (Whitmarsh et al., 1996).

Zur Aktivierung der p-38 MAPK führen zahlreiche Stimuli, darunter Interleukin-1, Tumornekrosefaktor- α und zellulärer Streß (Whitmarsh et al., 1996). Unter zellulärem Streß versteht man Beeinträchtigungen der zellulären Funktion durch UV-Strahlung, Lipopolysaccharide, Proteinsyntheseinhibitoren, Hitzeschock und osmotischen Streß.

Die Aktivierung der p-38 Kinase zieht den oben beschriebenen Aktivierungsmechanismus über das Drei-Kinasen-Modul nach sich. Die Aktivierungsschleife besteht bei der MAP-Kinase p-38 aus Threonin-Glycin-Tyrosin

(Raingeaud et al., 1995). Negativ wird die p-38 MAPK über Proteinkinasephosphatasen reguliert. Diese Phosphatasen dephosphorylieren die Thr-Gly-Tyr Aktivierungsschleife, wodurch die Aktivität der p-38 Kinase abnimmt (Whitmarsh et al., 1996).

Zu den Substraten der MAPK p-38 gehören Transkriptionsfaktoren: ATF- α (Casillas et al., 1993), Elk-1 (Raingeaud et al., 1996), Max (Zervos et al., 1995). Der Transkriptionsfaktor max heterodimerisiert mit c-Myc, einem Substrat der MAPK-ERK, was auf eine Verbindung zwischen dem Signaltransduktionsweg der p-38 MAPK und der ERK-MAPK hinweist.

Mögliche biologische Funktionen der p-38 MAPK lassen sich aus einer Hemmung der p-38 Kinase durch den spezifischen Inhibitor SB 203580 und den daraus entstehenden Funktionsausfällen ableiten. So wurde festgestellt, daß durch Einsatz von SB 203580, die Bildung der Zytokine Interleukin-1 und Tumornekrosefaktor- α in Makrophagen blockiert wurde (Lee et al., 1994). Daraus konnte abgeleitet werden, daß p-38 bei der Produktion von Interleukin-1 in hämatopoetischen Zellen eine wichtige Rolle spielt. Ebenso wurde durch SB 203580 die Zytokin-stimulierte Zellproliferation vermindert (Crawley et al., 1997).

Ein wichtiges Bindeglied zwischen erhöhtem Glukosespiegel, dadurch bedingter vermehrter Ausschüttung von Insulin, und durch MAP-Kinasen vermittelte Stimulierung der Proteinsynthese, stellt die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI 3-Kinase) dar.

Die PI 3-Kinase spielt eine wichtige Rolle in einer Reihe von durch Hormonen und Wachstumsfaktoren vermittelten intrazellulären Signaltransduktionskaskaden (Drake et al., 2000). Es wird angenommen, daß die PI 3-Kinase bei der Regulation von Stoffwechselwirkungen des Insulins, z.B. Glukosetransport oder die Aktivierung der Glykogensynthase, beteiligt ist (Cohen et al., 1997).

Wie sieht nun der Signaltransduktionsweg vom extrazellulären Insulin bis zur Aktivierung der Proteinsynthese, vermittelt durch MAP-Kinasen aus?

Insulin bindet an die α -Untereinheit des Insulinrezeptors (IRK), dadurch werden eine Reihe von Proteinkinasen, die mit der β -Untereinheit des IRK assoziiert sind, aktiviert. Zu diesen Proteinkinasen zählen auch IRS 1 und IRS 2 (Insulinrezeptorsubstrat 1 und 2), welche zu den Schlüsselsubstraten des Insulinrezeptors gehören (Sun et al., 1995). IRS 1 und IRS 2 interagieren mit einem bestimmten Phosphotyrosinrest an der β -Untereinheit des IRK und werden dann anschließend vom Rezeptor an den Tyrosinresten phosphoryliert. Dadurch wird es möglich, daß IRS 1 und IRS 2 mit SH2-Domänen enthaltenden Proteinen interagieren und diese an die Plasmamembran rekrutieren. Zu diesen Proteinen gehört auch die IP 3-Kinase, deren Aufgabe wiederum darin besteht, PtdInsP₃ und PtdInsP₂ zu aktivieren.

In zahlreichen Veröffentlichungen konnte nachgewiesen werden, daß die MAP-Kinasen durch IP 3-Kinase reguliert werden (Yamboliev et al., 2000; Ui et al., 1995), da Wortmannin und LY 294002, zwei spezifische Inhibitoren der IP 3-Kinase, die Stoffwechselwirkungen der MAP-Kinasen im Sinne einer Hemmung beeinflussen konnten.

Ebenso konnte gezeigt werden, daß die IP 3-Kinase als Effektor für einen Ligandengesteuerten Ca²⁺-Kanal zur Verfügung steht (Wilcox et al., 1998), der dazu führt, daß intrazellulär Calcium zwischen die Kompartimente strömen kann. Da der IP 3-Kinase Rezeptor sich vor allem am endoplasmatischen Retikulum befindet, wird postuliert, daß IP 3 ein wichtiger intrazellulärer zweiter Botenstoff (second messenger) sein könnte, der Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern freisetzt (Erneux et al., 1998; Negulescu et al., 1992). Diese Calciumfreisetzung wiederum wird mit einer Reihe von physiologischen und pathophysiologischen Veränderungen bei Patienten mit Diabetes mellitus in Verbindung gebracht.

Bislang ist es nicht hinreichend gelungen, den Zusammenhang zwischen Erhöhung des Blutglukosespiegels, der daraus resultierenden osmotischen Zellvolumenänderung und den funktionellen Veränderungen (z.B. endotheliale Dysfunktion) aufzuklären. Ein mögliches Bindeglied könnte die kürzlich klonierte humane Serin/Threoninkinase h-sgk darstellen, deren Genexpression durch Zellvolumenänderungen beeinflusst wird.

1.3. Die zellvolumenregulierte Kinase h-sgk

Bei der Suche nach zellvolumenregulierten Transkripten in einer menschlichen Hepatozytomlinie stieß man auf die Serin/Threoninkinase h-sgk (Waldegger et al., 1998). Diese Kinase ist das menschliche Homolog zu einer Serum- und Glukokortikoid-regulierten Kinase, die zuerst aus einer Ratten Mamma-Carcinom-Zelllinie kloniert wurde (Webster et al., 1993).

Das sgk Gen kodiert für ein Protein von 49kDa, das bis zu 55% Sequenzhomologie innerhalb seiner katalytischen Domäne mit der rac-Proteinkinase, der Proteinkinase C Familie, der ribosomalen Kinase S6 und der von zyklischem AMP-abhängigen Proteinkinase aufweist.

Keinerlei Homologien zu diesen Kinasen zeigt allerdings der N-terminale Proteinrest, der im Vergleich zur katalytischen Domäne relativ kurz ist. Die humane Serin/Threoninkinase sgk kann somit nicht eindeutig einer bestehenden Subfamilie zugeordnet werden.

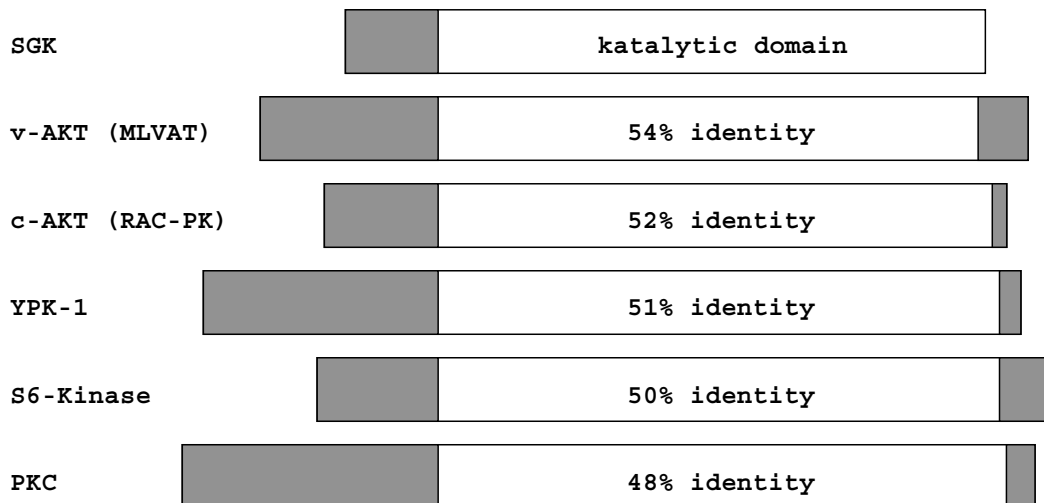


Abb.5: Schematischer Sequenzvergleich der katalytischen Domäne der sgk-Proteinkinase mit anderen Serin/Threonin-Proteinkinasen. Die höchste

Sequenzhomologie besteht zu dem viralen Onkogen-Produkt eines murinen Leukämievirus (v-AKT oder MLVAT) und dessen mammalisches Homolog, die c-AKT-Kinase (=RAC-Proteinkinase). Die katalytischen Domänen der Hefe (Saccharomyces)-Kinase YPK-1, der Protein-S6-Kinase und der Proteinkinase C zeigen ebenfalls hohe Sequenzhomologien. Innerhalb der extrakatalytischen Proteinregionen (grau unterlegt) bestehen keine Sequenzübereinstimmungen (Waldegger et al., 1998).

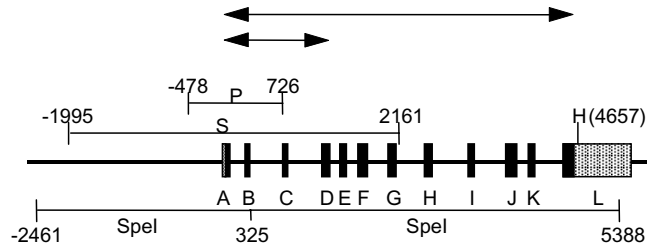
Die h-sgk mRNA wird in allen menschlichen Geweben exprimiert, mit den höchsten Transkriptkonzentrationen in der Bauchspeicheldrüse, der Leber und dem Herzmuskel. Im Unterschied zur transkriptionellen Regulation des Ratten sgk-Gens ist die mRNA Expression der menschlichen Serin/Threoninkinase h-sgk durch Serum-und Glukokortikoide nicht induzierbar, ebenso befinden sich auf dem für das sgk-Gen verantwortlichen Promotorelement keinerlei Konsensuselemente, die durch Glukokortikoide oder Serum reguliert würden.

Die Transkription der sgk wird sowohl durch Osmolaritätsänderungen, als auch durch Änderungen des Zellvolumens bei gleichbleibender extrazellulärer Tonizität reguliert.

Zellschrumpfung führt zu einer raschen Induktion der Transkription von sgk mRNA, während Zellschwellung die Transkriptionsrate der sgk deutlich reduziert. Beide Vorgänge sind unabhängig von der Proteinneusynthese. Die Abhängigkeit der sgk Transkriptionsrate von extrazellulären Stimuli legt nahe, daß die sgk möglicherweise zu einer neu in Erscheinung tretenden Subfamilie von Serin/Threoninkinasen, die auf transkriptioneller Ebene reguliert werden, gehört. Mitglieder dieser Familie sind *snk*, *sgk*, *plk* und *fnk* (Waldegger et al., 1997). Diese Kinasen werden alle überwiegend auf transkriptioneller Ebene durch Hormone oder Mitogene reguliert. Die Gene, die für diese Gruppe von Serin/Threonin Proteinkinasen kodieren, gehören zu den sogenannten primären Responsgenen (immediate early genes). Diese stellen eine sehr heterogene Genfamilie dar, die über achtzig verschiedene Mitglieder umfaßt und deren Gemeinsamkeit darin besteht, von der Proteinneusynthese unabhängig transkriptionell

Einleitung

reguliert zu werden. Die genomische Struktur und die chromosomale Lokalisation dieser neuen humanen Serin/Threoninkinase ist bereits weitestgehend aufgeklärt (Waldegger et al., 1998).



Exon	Nucleotide position	5'Splice donor	Intron length (bp)	3'Splice acceptor
A	71	T.C. AT.C. Cgt gagt	145	ccacagCt. TT.C. A
B	147	C. AAA. CAgT aagt	430	ct gcagC. CCT. GA
C	223	. CCT. CCAgt aagt	438	t t ct agCCA AG.
D	313	. GGA. AACgt aat t	104	t t t cagCT. CT.
E	412	. AAA. GAGgt at ga	119	t cct agGAG. AAG
F	544	. GGA. GAGgt gaagc	248	ct gcagT TG TT.C.
G	657	T. TAT. AAgT aagc	345	t t acagA. GAC. TT
H	781	. CCG. GAGgt aggc	460	t t t cagT AT. CT.C.
I	877	. GGC. CT Cgt gagt	458	t t t cagCCG. CCT.
J	1033	. GAC. TT Cgt gagt	107	caacagAT G GAG
K	1123	. AAT. CT Cgt gagt	389	t cacagAG. CGG

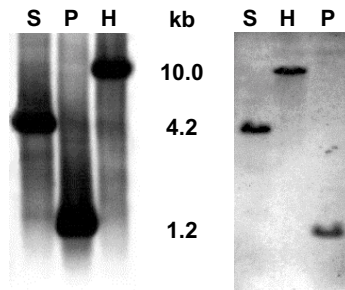


Abb.6: Genomische Struktur des *sgk*-Gens. Die schwarzen Rechtecke im oberen Teil der Abbildung symbolisieren die kodierende Region der 12 Exon-Sequenzen, wohingegen die schraffierten Rechteckanteile die 5'-und 3'-untranslatierten Genbereiche andeuten. Die numerischen Nukleotid-Positionsangaben beziehen sich auf das A im Startcodon ATG. Die *Spe I*-, *Sac I* (S)- und *Pst I* (P)-Restriktionsfragmente, die für die Southern-Blot-Identifizierung des *sgk*-Gens verwendet wurden, sind mit den jeweiligen Positionsangaben der Schnittstellen als Linien dargestellt. Die Position einer singulären

Hind III-Schnittstelle (H) ist ebenfalls markiert. Der obere und untere Doppelpfeil repräsentiert die relativen Positionen der c-DNA-Sonden, die für die Identifizierung des sgk-P1-Klons eingesetzt wurden.

Im mittleren Teil der Abbildung sind die Sequenzen der Exon-Intron-Übergänge dargestellt. Die numerischen Positionswerte beziehen sich auf die korrespondierende cDNA-Sequenz, wobei das A des Startcodons ATG die Position 1 einnimmt. Angegeben sind jeweils die Positionen des ersten Nukleotids der hier dargestellten 5' Splice-Donor-Sequenzen. Die Großbuchstaben markieren hierbei die Exon-Sequenzen. Nukleotid-Triplette im korrekten Leserahmen sind voneinander durch Punkte getrennt, und die GT-AG Konsensus Splice Donor-Akzeptorsequenzen sind unterstrichen.

Der untere Teil der Abbildung zeigt die vergleichende Southern-Blot-Hybridisierungen, die nach Restriktionsverdau der sgk-P1-DNA (links) bzw. humaner, lymphozytärer genomischer DNA (rechts) durchgeführt wurden. Die Größe der DNA-Fragmente ist in Kilobasen (kb) angegeben (Waldegger et al., 1998).

S=Sac I, P=Pst I, H=Hind III

Die kodierende Sequenz des *sgk* Gens ist in 12 Exone aufgeteilt, die von relativ kurzen intronischen Sequenzen unterbrochen werden. Alle Exon-Intron Bereiche erfüllen die GT-AG Regel. Zwischen der Nukleotidsequenz der Exons und der korrespondierenden *sgk* c-DNA konnte kein Unterschied festgestellt werden. Eine mögliche TATA-Box ist 35 Nukleotide oberhalb des Startpunktes lokalisiert. Eine ungefähr 200 Basenpaare lange Region, die sich in 5' Richtung an die TATA-Box anschließt, fiel durch einen sehr hohen Anteil von GC (80%) auf. Innerhalb dieser Region befindet sich auch eine Konsensus-Sequenz für eine GC-Box. Auffällig ist die Vielzahl an potentiellen AP-2 (Transkriptions-Aktivator Protein 2) Bindungsstellen in einer Analyse der klonierten Promotorregion (Waldegger et al., 1998).

Mittels FISH (Fluoreszenz in situ Hybridisierung) konnte die chromosomale Lokalisation der humanen *sgk* bestimmt werden (Waldegger et al., 1998). Das für die *sgk* verantwortliche Gen liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 6.

Die genaue Lokalisation ist 6q23. Bezüglich der *Mendelian Inheritance in Man gene map* sind verschiedene genetische Erkrankungen auf Defekte an diesem Genort zurückzuführen (Barletta et al., 1987): okulodentodigitale Dysplasie, transienter Diabetes mellitus bei Neugeborenen, angeborene Persistenz fetalen Hämoglobins, autosomale nicht-syndromische Innenohrschwerhörigkeit, myoklonische Epilepsie Typ Lafora und familiäre atypische Mykobakteriose. Darüber hinaus sind Deletionen auf 6q23 häufig assoziiert mit verschiedenen myeloischen, lymphatischen, mesenchymalen und epithelialen Neoplasien (Mitelman et al.1997). Da das *sgk* Gen auf dem selben Locus wie diese Erkrankungen lokalisiert ist, liegt die Vermutung nahe, daß *sgk* möglicherweise an der Pathogenese einer dieser Erkrankungen beteiligt ist.

Die in vitro erhobenen Befunde bezüglich der transkriptionellen Regulation des *sgk*-Gens spielen möglicherweise auch in vivo eine bedeutsame physiologische und pathophysiologische Rolle.

Die Proteinkinase sgk ist möglicherweise mit einigen entzündlichen Erkrankungen, wie Morbus Crohn, Glomerulosklerose und Hepatitiden assoziiert. Da Veränderungen des Zellvolumens durch Veränderungen der extrazellulären Tonizität ein wichtiger Streßfaktor für intestinale Epithelzellen während Aufnahme und Verdauung von Nahrung ist, wurde das intestinale Expressionsmuster der sgk untersucht. Während beim Gesunden die sgk hauptsächlich in den apikalen Darmepithelzellen exprimiert wird und es in den Darmkrypten und der Lamina propria nicht zur Expression der sgk kommt, stellt sich das Verteilungsmuster der humanen sgk bei entzündlichen Darmerkrankungen gänzlich anders dar. Sowohl die Darmkrypten, als auch zahlreiche Entzündungszellen (Monozyten) in der Lamina propria weisen eine hohe Expression der sgk auf (Waldegger et al., 1999). Diese Verteilungsmuster stimmen mit der Verteilung von TGF- β überein. Autokrin sezerniertes TGF- β ist ein wichtiges Regulatorelement für das Wachstum und die Differenzierung von Enterozyten. TGF- β könnte ein möglicher Faktor sein, der das Verteilungsmuster von sgk im menschlichen Intestinum beeinflusst.

Ein Zusammenhang zwischen einer durch Hyperglykämie induzierten Zunahme der Expressionsrate der h-sgk und des pathophysiologischen Mechanismus bei diabetischer Nephropathie konnte kürzlich nachgewiesen werden (Lang et al., 2000).

So konnte gezeigt werden, daß erhöhte extrazelluläre Glukosekonzentrationen über Aktivierung von Proteinkinase C und Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels zu einer Zunahme der Transkriptionskonzentration der h-sgk führte (Lang et al., 2000). Diese Beobachtungen weisen nicht nur die erhöhte Transkriptionskonzentration bei diabetischer Nephropathie nach, sondern legen neue Erkenntnisse über die mögliche physiologische Funktion der h-sgk dar. Die Fähigkeit der h-sgk den epithelialen Natriumkanal zu aktivieren (Naray-Fejes-Toth et al., 1999), könnte erklären helfen, die Rolle der h-sgk bei der Entstehung der diabetischen Glomerulosklerose Kimmelstiel-Wilson aufzudecken.

1.4. Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war, den Zusammenhang zwischen Veränderung des Zellvolumens in Endothelzellen und der transkriptionellen Regulation der humanen Serin/Threoninkinase h-sgk aufzuklären.

Das Interesse galt hierbei vor allem der möglichen Beteiligung der Proteinkinase C bzw. eines erhöhten intrazellulären Calciumspiegels an der für die Genexpression der h-sgk, beteiligten Signaltransduktionskette.

Um Hinweise auf die Signaltransduktionskaskade gewinnen zu können, sollte mit Hilfe einer Promotoranalyse die verantwortlichen Transkriptionsfaktorbindungsstellen identifiziert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Allgemeine Materialien

2.1.1. Geräte

- ◆ Zentrifugen: Centrifuge 5415 C (Eppendorf, Hamburg)
Biofuge 22 R (Heraeus, Osterode)
- ◆ Gelkammer: Agagel mini (Biometra, Göttingen)
- ◆ Photometer: RNA/DNA Calculator Gene Quant (Amersham, Little Chalfont/ England)
- ◆ UV-Licht und Polaroidkamera: Polaroid MP4+ Instant Camera System
- ◆ Vakuum Trockner: Vacuum Concentrator (Bachofer, Reutlingen)
- ◆ Blotter: Vacuum Blotter (Appligene Oncor, Illkirch/Frankreich)
- ◆ Crosslinker: UV-Stratalinker 2400 (Stratagene, La Jolla/USA)
- ◆ Hybridisierungsöfen: Personal Hyb (Stratagene, La Jolla/USA)
- ◆ Entwicklermaschine: Hyperprocessor (Amersham, Little Chalfont/England)
- ◆ PCR-Maschine: Techne Genius (Termo-Dux, Wertheim)
- ◆ Luminometer: Berthold Bioluminat LB 9500
- ◆ Wasserbad: julabo SW-20 C
- ◆ Mikroskop: Nikon TMS (Nikon/Japan)
- ◆ Heizblock: Test tube Thermostat Model TCR 100 (Roth, Karlsruhe)
- ◆ Heizplatte: IKAMAG RCT (ika-Werk, Staufen)
- ◆ Vortexer: Vortex Genie 2 (Bender & Hobein AG, Zürich/ Schweiz)
- ◆ Waage: Scaltec (Roth, Karlsruhe)
- ◆ Pipetten: Gilson Pipetman (Gilson/Frankreich), Roth, Eppendorf

- ◆ Pipettierhilfe: Pipettus akku (Hirschmann)
- ◆ Wasser-Destillator: Ministil (Christ, Leonberg)

2.1.2. Zubehör

- ◆ Pipettenspitzen (Roth, Karlsruhe/ Greiner, Frickenhausen)
- ◆ Falcontubes: cellstar PP-Röhrchen (Greiner, Frickenhausen)
- ◆ sterile Stabpipetten: (Greiner, Frickenhausen)
- ◆ Latex Einmalhandschuhe: Satin Plus (Safeskin, Neufahrn)
- ◆ Polaroidfilme: Black and White Print Film Type 667 (Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen)
- ◆ positiv geladene Nylonmembranen: (Boehringer, Mannheim)
- ◆ Küvette: Spectrophotometer Cuvet (Sigma, St. Louis/USA)

2.1.3. Käufliche Systeme

- ◆ DIG-Lumineszenz-Detektions-System (Boehringer, Mannheim)
- ◆ QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden)
- ◆ Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison/USA)

2.1.4. Chemikalien

- ◆ Roth, Karlsruhe:
Phenol/Chloroform, Isopropanol, Ethidiumbromid, Trisbase, Tris-Cl, EDTA, Glycerol, Xylen, Cyanol, H₂O₂, Formaldehyd, Natronlauge, Natriumacetat, Natriumchlorid, Natriumcitrat, Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat, Kaliumchlorid, Kaliumacetat, HEPES, SDS, Trypton, Hefe-Extrakt

- ◆ Sigma-Aldrich, St Louis, Milwaukee/USA:
Ethanol, Bromphenolblau, Maleinsäure, Polyethylenglykol, Natriumphosphat, Chloroform, Tween (=Polyethylen-Sorbitan-Monolaureat), DEAE-Dextran

- ◆ Merck, Darmstadt:
Isopropanol, Natriumchlorid, Calciumchlorid, Eisessig, Methylenblau, Glukose

- ◆ Boehringer, Mannheim:
MOPS, DIG-Blocking-Reagenz, DIG-Easy-Hyb

- Gibco/BRL, Life Technologies, Paisley/Scotland:
TRIZOL, Agarose, Agar

- ◆ Amresco, Ohio/USA:
DEPC, Formamid, DMSO

Die für bestimmte Methoden spezifischen Lösungen, Puffer und Chemikalien sind an den entsprechenden Stellen aufgeführt.

2.1.5 Zellkultur

Für die folgenden Experimente wurde HMEC-1 als permanente Zelllinie verwendet. Hierbei handelt es sich um menschliche, dermale, mikrovaskuläre Endothelzellen, die mit Simian Virus T-Zellen-Antigen transfiziert wurden (Ades et al., 1992). HMEC-1 weist alle Eigenschaften humaner mikrovaskulärer Endothelzellen auf, zum Beispiel die Expression von v.Willebrand-Faktor oder die Aufnahme von acetyliertem LDL.

Die Zelllinie wurde bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Als Grundmedium wurde M 199 (GIBCO/BRL) verwendet, zusätzlich wurden FCS 15 % v/v (Sigma), EGF 10ng/ml (Sigma), Hydrocortison (Sigma) und Gentamycin 0,5 % v/v (GIBCO/BRL) beigefügt.

Für die Zellkulturexperimente wurden folgende Agenzien eingesetzt:

Staurosporin (Calbiochem), Bumetanid (Sigma), HOE 694 (Hoechst-Marion-Roussel-AG), SB 202190 (Calbiochem), PDD (Phorbol-12,13-Didecanoat, Calbiochem), Glukose (Sigma), Raffinose (Sigma), Genistein (Calbiochem), Nifedipin (Sigma).

2.2. Methoden

2.2.1. Grundlegende Methoden

Aufreinigung von Nukleinsäuren:

Ziel dieser Technik ist die Entfernung von Proteinen. Dies spielt z.B. bei Verfahren eine Rolle, bei denen Enzyme, die im vorherigen Schritt gebraucht wurden, beim nächsten Schritt stören würden. Eine sehr weit verbreitete Methode ist hierbei die Phenol-Chloroform-Extraktion, bei der Proteine denaturiert und abgetrennt werden. Nach Zugabe desselben Volumens Phenol-Chloroform-Isomylalkohol (25:24:1, gesättigt mit TE-Puffer (10mMTris pH 7.5-8.0, 1mM EDTA-Na) zur Nukleinsäurelösung und gründlichem Durchmischen wird durch zweiminütige Zentrifugation bei Raumtemperatur die erhaltene Emulsion, in eine die Nukleinsäuren enthaltende wässrige Oberphase und eine die Proteine enthaltende organische Unterphase getrennt. Anschließend muß die wässrige Phase abpipettiert werden, die Nukleinsäure kann in einem neuen Gefäß dann gefällt werden.

Fällung von Nukleinsäuren:

Um Nukleinsäuren konzentrieren zu können oder sie in eine neue Pufferlösung zu überführen, ist es notwendig, diese Nukleinsäuren zu präzipitieren. Zu diesem Zweck wird der Nukleinsäure durch Salz- und Alkoholzugabe Wasser entzogen. Die Nukleinsäure denaturiert daraufhin und bildet ein Präzipitat, welches abzentrifugiert und im Anschluß daran im gewünschten Volumen eines geeigneten Puffers wieder gelöst werden kann.

Bei geringem Volumen und kleinen Fragmenten wurde mit 2.5 (DNA) bzw. 3 (RNA) Volumen 100%igem Ethanol präzipitiert. Bei größeren Fragmenten und höherem Volumen wurde die Isopropanolfällung bevorzugt. Der Vorteil der Isopropanolfällung besteht darin, daß man nur ein einfaches Volumen benötigt, allerdings ist die Fällungsausbeute auch etwas niedriger. Als Salzkomponente wurde 1/10 Volumen 3M Natriumacetat pH 5.2 hinzugefügt. Ethanolfällungen wurden mindestens 30 Minuten bei -20°C oder mindestens 15 Minuten bei -70°C inkubiert, bei Isopropanolfällungen betrug die Inkubationszeit lediglich 10 Minuten bei Raumtemperatur.

Nachdem das Präzipitat 15 Minuten lang bei 1200g und 4°C zentrifugiert wurde, kippte man den salzhaltigen Überstand vorsichtig ab. Die Nukleinsäure wurde in einem anschließenden Waschschrift mit 2.5fachem bzw. dreifachem Volumen an 70% Ethanol vom überschüssigen Salz befreit, nochmals 10 Minuten unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert und der Alkohol vorsichtig entfernt, bevor die Nukleinsäure nach einem kurzen Trocknungsschritt, bei dem der restliche Ethanol verdampfen sollte, im neuen Puffer aufgenommen wurde.

Quantitative Messung von Nukleinsäuren:

Die einfachste Methode zur quantitativen Analyse von Nukleinsäuren ist die photometrische Bestimmung der UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 260nm, wozu allerdings genügend und aufgereinigte Nukleinsäure vorliegen muß. Zur Reinheitskontrolle wurde der Quotient aus OD 260 und OD 280 bestimmt, der oberhalb 1.5 liegen sollte.

Wenn mehr Volumen zur Verfügung stand, konnte ein Ethidiumbromidgel beladen werden und die Banden quantitativ beurteilt werden.

DNA-Gelelektrophorese:

Die Gelelektrophorese ist die Standardmethode zur Auftrennung, Identifikation und Reinigung von DNA-Fragmenten mit einer Länge von 100 bp (Basenpaaren) bis zu 50 kbp.

Als feste Matrix der Gelelektrophorese wird Agarose verwendet. Agarose ist ein lineares D-Galaktose, 3,6-anhydro-L-Galaktose Polymer, das in Seetang enthalten ist. Agarosepulver wird im gewünschten Puffer so lange erhitzt, bis eine klare Lösung entsteht, die dann in Form gegossen werden kann. Bei der Aushärtung des Gels formt sich eine Matrix, deren Dichte proportional zur Konzentration der Agarose ist.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt in einem horizontalen elektrischen Feld konstanter Stärke und Richtung. Bei neutralem pH ist die DNA negativ geladen, weswegen sie zur Kathode wandert. Die Geschwindigkeit mit der die DNA in Richtung Kathode wandert ist umgekehrt proportional zu der Größe des DNA-Fragments. Für Fragmente von 0.7 bis 7 kb verwendet man 1%ige Gele, bei kleineren Fragmenten werden bevorzugt 1.5% oder 2% Agarosegele verwendet.

Die angelegte Spannung sollte nicht mehr als 5V/cm Elektrodenabstand betragen, da die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA bei sehr großen Fragmenten überproportional zunimmt, so daß es zu einer Verschlechterung der Auftrennung kommt. Die Elektrophorese wird bei Raumtemperatur durchgeführt, da zwischen 4°C und 30°C die elektrophoretische Motilität konstant ist.

Als Laufpuffer wurde ein aus 40mM Tris-Acetat und 1mM EDTA bestehender TAE-Puffer verwendet, der auf einen pH Wert von 7.5-7.8 titriert wurde.

Je nach Anzahl der aufzutragenden Proben und je nachdem wie groß das Volumen ist, in dem die DNA gelöst ist, werden unterschiedliche Kämmen verwendet, um unterschiedlich viele und große Geltaschen zu erhalten.

Als Ladepuffer wurde eine 6fach konzentrierte 30% Glycerol enthaltende Flüssigkeit, die außerdem noch 0.25% Bromphenolblau und 25% Xylene Cyanol zur Visualisierung der Proben im Gel beinhaltet, verwendet. Die hohe Dichte des Puffers führt zum Absinken der Proben in den Geltaschen.

Zur Anfärbung der DNA im Agarosegel wurde Ethidiumbromid verwendet. Ethidiumbromid ist ein krebserregender Farbstoff, der eine planare Gruppe enthält und zwischen Nukleinsäurebasen interkaliert, wo er eine fixe Position einnimmt. Er absorbiert UV-Licht und strahlt die Energie als rot-oranges Licht von 550nm wieder ab. Der an die

DNA gebundene Farbstoff fluoresziert pro Fläche stärker, als der sich im Gel befindliche, was dazu führt, daß sich die DNA-Banden vom Gelhintergrund deutlich abheben. Durch dieses Färbeverfahren können bis zu 10ng DNA sichtbar gemacht werden. Mit Ethidiumbromid kann ebenso RNA angefärbt werden. Ethidiumbromid kann entweder dem Agarosegel von Anfang an zugesetzt werden oder man kann das Gel nach der Elektrophorese für 30 Minuten anfärben (in einer Konzentration von 0.5µg/ml). Die Fluoreszenz der DNA/RNA Banden kann mit sensitiven Polaroidfilmen festgehalten werden. Zur Bestimmung des Molekulargewichts der zu erwartenden Banden kann man einen Marker mitlaufen lassen. Dieser Marker ist eine Mischung aus DNA-Fragmenten definierter Länge, anhand derer dann nach Färbung mit Ethidiumbromid die ungefähre Größe der aufgetragenen DNA abgeschätzt werden kann.

2.2.2. Northern Blot Hybridisierung

Der Anteil der RNA in menschlichen Zellen verteilt sich auf 80-85% ribosomale RNA und 10-15% transfer-RNA (tRNA) und small nuclear-RNA (snRNA). Die für Proteine kodierende messenger-RNA (mRNA) macht lediglich 1-5% der zellulären RNA aus.

Wenn man nun die Transkription eines bestimmten Gens untersuchen möchte, kann man mit Hilfe einer spezifischen Sonde die entsprechende mRNA und auch die quantitativen Veränderungen der m-RNA, die als Reaktion der Zelle auf bestimmte Stimuli resultieren, nachweisen.

Zur Extraktion und Aufreinigung von RNA, ist es überaus wichtig, die Aktivität von RNAsen zu minimieren. Diese RNAsen werden während der Zellyse freigesetzt, befinden sich jedoch auch auf der Haut oder Gegenständen. Um Kontamination mit RNAsen möglichst zu vermeiden, wurde bei allen Arbeiten mit RNA Handschuhe getragen. Lösungen und Gerätschaften, die für die Arbeit mit RNA verwendet wurden, wurden getrennt von anderen Lösungen aufbewahrt. Wasser und wäßrige Lösungen wurden mit 0.1% DEPC (Diethylpyrocarbonat), einem RNase-Inhibitor, versetzt.

Zur Lyse der Endothelzellen wurden je 1ml Trizol pro Zellschälchen verwendet. Trizol ist eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidino-Isothiocyanat, die die Lyse der Zellen und Zellkomponenten bei erhaltener RNA ermöglicht.

Bei der anschließenden Chloroform-Extraktion der Phenolphase wurden Proteine entfernt. Zuerst wurden pro Zellschälchen 200µl Chloroform zugefügt. Nach Durchmischung und Zentrifugation wurde das Lysat in verschiedene Phasen unterteilt. In der Oberphase befindet sich die RNA und in der Unterphase Proteine und organische Bestandteile, in der mittleren Phase befindet sich die DNA. Nun wurde die Oberphase, die die RNA enthielt, abpipettiert. Daraufhin wurde dasselbe Volumen an Isopropanol zugegeben, die RNA Fraktion wurde dann präzipitiert und abzentrifugiert. Das überschüssige Salz wurde durch Waschen mit 70%igem Ethanol entfernt. Die RNA-Pellets wurden dann getrocknet und in DEPC-Wasser gelöst. Die Konzentration der RNA konnte anschließend photometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt werden. Um die RNA aufbewahren zu können, wurde die RNA mit 1/10 Volumen 3M Natriumacetat und dreifachem Volumen 100% Ethanol gefällt und für mindestens 15 Minuten bei -70°C eingefroren. Für jede zu untersuchende RNA-Probe wurde ein 20µg entsprechendes Volumen des Fällungsansatzes zentrifugiert, das erhaltene Pellet in fünffachem Volumen 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend unter Vakuum-Zentrifugation getrocknet.

Um eine Dekontamination mit RNAsen zu vermeiden, wurden Gelkammer und Kämmen für mindestens 30 Minuten mit 3%igem H₂O₂ vorbehandelt. Zur Auftrennung der RNA wurde ein 1%iges mit 2.2 mol/l Formaldehyd versetztes Agarosegel verwendet. Um dieses Agarosegel herzustellen, wurden 0.5g Agarose in 31ml DEPC-behandeltem Wasser in der Mikrowelle gekocht und anschließend mit 10fachem 5x Formaldehyd-Laufpuffer und 9ml Formaldehyd mit pH-Wert > 4 versetzt und in die Gelform gegossen.

Der 5x Formaldehyd-Laufpuffer setzt sich zusammen aus:

0.1M MOPS (3-N-morpholino)propansulfonsäure, pH 7

40mM Natriumacetat

5mM EDTA, pH 8.0 in H₂O_{DEPC}

Mit 1N NaOH wurde er auf pH 7.0 eingestellt , sterilfiltriert, DEPC behandelt, autoklaviert und unter lichtgeschützten Bedingungen gelagert. Der Formaldehyd-Laufpuffer wurde dann mit H₂O_{DEPC} 5fach verdünnt. Der denaturierende Puffer, in dem die RNA-Pellets aufgenommen wurden setzte sich folgendermaßen zusammen:

4,5µl H₂O_{DEPC}

2.0µl 5x Formaldehyd-Laufpuffer

3.5µl Formaldehyd, pH >4

10.0µl Formamid.

Nachdem die Pellets in den denaturierenden Puffer aufgenommen wurden, wurden sie für 15 Minuten bei 65°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben mit Ladepuffer versetzt, dieser setzte sich zusammen aus:

50% Glycerol

1mM EDTA

0.25% Bromphenolblau

0.25% Xylene Cyanol.

Anschließend wurde das Gel mit den Proben beladen. Die elektrophoretische Auftrennung wurde bei 90V Gleichspannung für 2h durchgeführt. Für die Zirkulation des Laufpuffers sorgte ein Pumpsystem, das zwischen den beiden Reservoirs angebracht war, um entstehende pH-Wert Unterschiede an den Elektroden auszugleichen, dabei wurden die Schläuche des Pumpsystems zur Kühlung durch Eiswasser geleitet.

Im Anschluß an die Elektrophorese wurde das Formaldehyd aus dem Gel gewaschen mit 0.5µg/ml Ethidiumbromid versetzten H₂O_{DEPC} unter Lichtschutz. Zugleich konnte damit die Gesamt-RNA angefärbt und unter UV-Licht die gleichmäßige Beladung der Spuren überprüft und auf Polaroidfilm festgehalten werden.

Das Prinzip des Blotting-Verfahrens besteht in der Übertragung der aufgetrennten Proben vom Gel auf eine Membran. Als Transferpuffer wurde verwendet:

10x SSC (Standard Saline Citrate); 20x SSC enthält 3 M NaCl sowie 300 mM Natriumcitrat bei pH 7.0 in H₂O_{DEPC} . Der Transfer der RNA auf eine positiv geladene Nylon-

membran erfolgte durch Anlegen eines Unterdruckes von 50 mbar in einem Vacuum-Blotter für mindestens 2h. Nach dem Transfer wurde die RNA mit 120 mJ UV-Bestrahlung kovalent vernetzt. Im Anschluß daran wurde die Nylonmembran in einem Falcontube für mindestens 30 Minuten im Hybridisierungssofen bei 50°C in 15ml DIG-Easy-Hyb-Lösung prähybridisiert. 125ng einer DNA-Sonde wurde durch 5minütiges Kochen denaturiert und zu 5ml Hybridisierungslösung gegeben, die Hybridisierung wurde über Nacht bei 50°C durchgeführt. Die Konzentration der Sonde betrug somit 25ng/ml.

Im nächsten Schritt mußte die Membran gewaschen werden und zwar nach folgendem Schema:

2x5 Minuten bei Raumtemperatur mit 2x SSC, 0.1% SDS (Sodiumdodecylsulfat)

2x15 Minuten bei 65°C mit 0.5xSSC, 0.1% SDS. Im Anschluß daran, wurde die Membran bei Raumtemperatur für mindestens 30 Minuten in 10ml Blockierungslösung inkubiert, um unspezifische Bindungen des Antikörpers an die Nylonmembran zu verhindern. Die Blockierungslösung bestand aus:

20ml 10x DIG-Blockierungspuffer (10g Blockierungsreagenz auf 100ml Maleinsäurepuffer bei 65°C gelöst, autoklaviert),

20ml 10x Maleinsäurepuffer (1.0 M Maleinsäure und 1.5 M NaCl, mit NaOH auf pH 7.5 titriert), mit H₂O auf 200ml aufgefüllt.

Danach wurde 1µl des Anti-DIG-Antikörpers zu der Membran in der Blockierungslösung zugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Antikörper des DIG-Lumineszenz-Detektions-Systems reagiert mit den DIG-gekoppelten dUTP-Molekülen der Sonde und ist mit dem Enzym alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt.

Nun mußten Antikörper, die sich unspezifisch gebunden hatten, entfernt werden. Dazu wurde die Membran zweimal 30 Minuten lang mit Maleinsäurewaschpuffer gewaschen.

Der Maleinsäurewaschpuffer wurde wie folgt hergestellt:

Maleinsäure-Puffer und 3ml/l Tween 20.

Anschließend wurde die Membran kurz in Detektionspuffer äquilibriert. Der Detektionspuffer bestand aus:

0.1 M Tris

0.1 M NaCl

0.5ml konz HCl pro 1000ml , pH 9.5, sterilfiltriert.

Danach wurde die Membran mit 7 μ l CDP-Star, dem Substrat der alkalischen Phosphatase (1:100 verdünnt in Detektionspuffer) bedeckt. Die Membran wurde in einer Filmkassette zwischen zwei Plastikfolien positioniert. Nach mindestens 15 Minuten Expositionszeit konnten ECL-Filme belichtet werden. Die Lichtsignale der Chemolumineszenz wurden hierbei als Fluorogramm festgehalten. Je nach Menge der mRNA mußten die Filme zwischen mehreren Minuten und bis zu einer Stunde exponiert werden.

Um zu überprüfen, ob die RNA gleichmäßig auf die unterschiedlichen Spuren der Nylonmembran geblottet wurde, wandte man die Methyleneblau-Färbung an. Hierzu wurde die Membran zuerst 15 Minuten bei Raumtemperatur in 5% Essigsäure und danach 5 Minuten in einer Lösung aus 0.5 M Natriumacetat (pH 5.2) und 0.04% Methyleneblau gewaschen. Durch diese Waschschrirte wurde die RNA fixiert und mit blauem Farbstoff versehen. Die Hintergrundfarbe konnte durch 5-10minütiges Waschen in H₂O entfernt werden.

2.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Methode der Polymerasekettenreaktion, die in den achtziger Jahren von Kary Mullis entwickelt wurde, ermöglicht es uns, eine enorme Anzahl von Kopien einer spezifischen DNA-Sequenz zu produzieren.

Bei der PCR-Methode nutzt man bestimmte Eigenschaften der DNA-Replikation. Die DNA-Polymerase bedient sich der Einzelstrang-DNA als Matrize für die Synthese eines neuen, komplementären Stranges. Diese einzelsträngigen DNA-Vorlagen kann man einfach dadurch erzeugen, daß man doppelsträngige DNA auf Temperaturen nahe dem Siedepunkt erhitzt. Außerdem benötigt man ein kurzes Stück doppelsträngiger DNA, um die Synthese zu beginnen - "Primer".

Man gibt nun die beiden Oligonukleotidprimer, diese geben die Startpunkte der DNA-Synthese vor, die DNA-Polymerase und eine Mischung der vier Desoxynukleotidvorläufer in das Röhrchen, das die DNA enthält. Das Gesamtvolumen beträgt dann 100µl.

Im nächsten Schritt wird das Reaktionsgemisch auf 94 °C erhitzt. Bei dieser Temperatur trennen sich die DNA-Stränge vollständig voneinander. Sie bilden dann Einzelstränge, die zu Matrizen für die Primer und die DNA-Polymerase werden. Anschließend wird die Temperatur gesenkt, damit sich die Primer an die komplementären Sequenzen der DNA-Moleküle binden können-“Annealing”. Die Annealing-Temperatur läßt sich nach folgender Formel bestimmen:

$$T = 4 \cdot (G + C) + 2 \cdot (A + T) - 5 \text{ °C}$$

T: Annealing -Temperatur

G: Anzahl der Guaninbasen im Primer

C: Anzahl der Cytosinbasen im Primer

A: Anzahl der Adeninbasen im Primer

T: Anzahl der Thyminbasen im Primer

Diese Annealing-Temperatur bestimmt entscheidend über die Spezifität der PCR-Temperatur und Dauer der Behandlung hängen also von den zu amplifizierenden Sequenzen ab. Dabei bilden sich die mit Primern verbundenen Matrizen für die DNA-Polymerase. Nun erhöht man die Temperatur auf 72 °C. Dies ist die optimale Temperatur für die hitzestabile Taq-Polymerase. Der Name “Taq” geht auf das Bakterium *Thermus aquaticus* zurück, das in heißen Quellen bei einer Temperatur von 75 °C lebt und dessen DNA-Polymerase ein Temperaturoptimum von 72 °C hat.

Die Temperatur wird bis zu fünf Minuten lang auf 72 °C gehalten, damit die DNA-Synthese ablaufen kann.

Am Ende dieser Zeitspanne erhöht man die Temperatur wiederum auf 94 °C, diesmal jedoch nur 20 Sekunden lang, so daß sich die kurzen Stücke doppelsträngiger DNA-

der ursprüngliche und der neu synthetisierte komplementäre Strang voneinander trennen.

Diese Einzelstränge werden nun in einer weiteren Runde der DNA-Synthese zu Matrizen.

Der ganze Zyklus – Erhitzen zur Trennung der Stränge, Binden der Primer und Synthese mit Hilfe der DNA-Polymerase – wiederholt sich 30- bis 60mal.

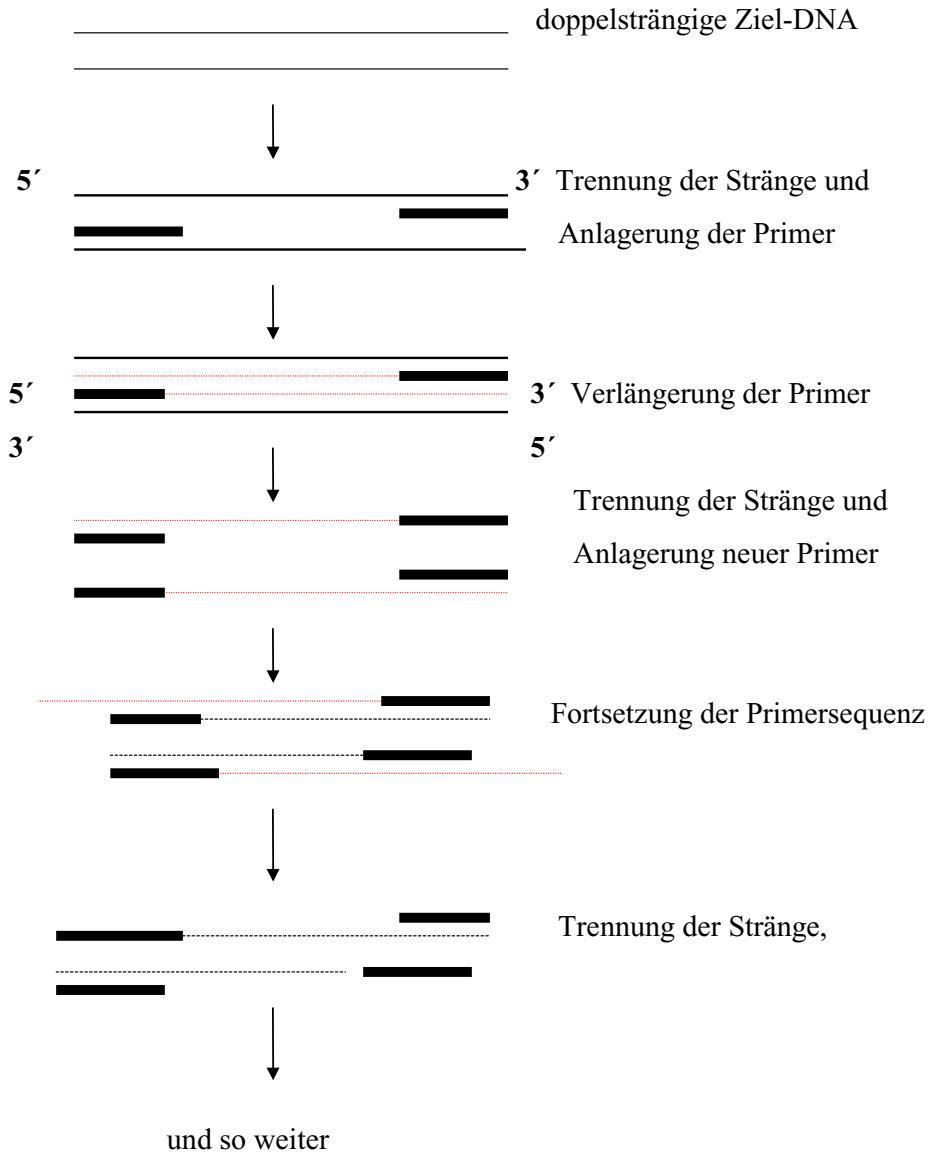


Abb. 7: Amplifizierung einer Zielsequenz

Die Amplifizierung wurde nach folgendem Temperaturschema durchgeführt:

1. Zyklus: 95 °C

2. - 31. Zyklus: 15 s bei 95 °C 15 s bei 50 °C und weitere 15 s bei 72 °C

32. Zyklus: 5 min bei 72 °C

Für die PCR wurden folgende Konzentrationen verwendet:

Template: 10µl

H₂O : 66µl

10fach buffer: 10µl

dNTP (DIG) : 10µl

RAP-A4 : 2µl

Taq-Polymerase : 20µl

2.2.4. Reporter-gen-Analyse

Zur Überprüfung, ob die Promotorkonstrukte Sac 2-Pro und 1.1 Pro an der Glukose-induzierten Genexpression der h-sgk in Endothelzellen beteiligt sind, führten wir eine Transfektion der Endothelzellen mit den entsprechenden Promotorkonstrukten und anschließend eine Reporter-genanalyse durch.

Transfektion: die Transfektion der Konstrukte in Endothelzellen wurde mit Hilfe des SuperFect-Reagenz von Quiagen durchgeführt.

Wir verwendeten Endothelzellen, die mindestens zu 40% (am besten bis zu 80%) konfluent waren. Um bestmögliche Ergebnisse zu erzielen, sollten 1-2x 10⁵ Zellen auf 30mm-Schälchen am Tag vor der Transfektion ausgesät werden.

Zubereitung der Plasmid DNA Lösung: 5µg DNA wurden in TE (pH 7,4) gelöst (Minimum der DNA Konzentration 0.1µg/µl), hierfür wurde Zellmedium ohne Antibiotika und ohne Serum verwendet. Das Gesamtvolumen betrug 100µl.

Zu der Lösung wurde dann 10µl der SuperFect Transfection Reagens (Quiagen) zugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 5-10 Minuten wurden die Zellen mit 2ml PBS gewaschen. Nun fügten wir 600 µl des Zellwachstumsmediums, das sowohl Antibiotika, als auch Serum enthielt, hinzu.

Unmittelbar nach Zugabe des Medium überführten wir das Gesamtvolumen auf 30mm-Schälchen und inkubierten die Lösung für 2-3 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂.

Anschließend wurde das Medium nochmals entfernt und mit 2ml PBS gewaschen.

Nach Zugabe neuen Zellmediums inkubierten wir für 24-48 Stunden.

Promotoranalyse zur Bestimmung der Luciferase-Aktivität:

Zur luminometrischen Quantifizierung der Luciferase-Aktivität verwendeten wir den Dual-LuciferaseTM Reporter Assay von Promega.

Dieses Reportersystem zeichnet sich dadurch aus, daß einer der beiden Reporter als interne Kontrolle verwendet wird, gegen die die Messung des anderen Reporters abgeglichen wird. Ein Vektor enthält hierbei das experimentelle Reportergen und ein zweites Reportergen, das als Kontrolle dient. Um eine interne Kontrolle für die transkriptionelle Aktivität zu gewährleisten, ist das zweite Reportergen an einen Promotor gebunden, der von den jeweiligen experimentellen Bedingungen unabhängig ist.

Verwendung der Firefly und Renilla-Luciferase:

Der Vorteil bei diesem Verfahren liegt darin, daß beide Luciferasen in einer einzigen Probe verarbeitet werden können, da die Inkubationszeiten gleich lang sind.

Bei der **Firefly-Luciferase** handelt es sich um ein 61kDa monomeres Protein, für dessen enzymatische Aktivität keine posttranslationelle Modifikation nötig ist. Die Photonenemission erfolgt über Oxidation von Käferluciferin, für die Emission ist das Vorhandensein von ATP, Mg²⁺, und O₂ notwendig.

Normalerweise würde die Lichtemission schnell wieder abnehmen, da die Zwischenstufe Luciferyl-AMP sich sehr schnell umwandelt. Aber unter Zugabe von Coenzym A, das im Assay bereits enthalten ist, erfolgt eine längerdauernde Lumineszenz.

Bei der **Renilla-Luciferase** handelt es sich um ein 36 kDa monomeres Protein. Ebenso wie bei der Firefly-Luciferase ist auch bei der Renilla-Luciferase keine posttranslatio-

nelle Modifikation notwendig. Zur Photonenemission sind O_2 und Coelenterazin notwendig.

Mit dem Dual Luciferase Reporter Assay System von Promega wurden sukzessive in den selben Lysaten Firefly und Renilla-Luciferase-Aktivität gemessen und anschließend der Quotient aus beiden Werten gebildet. Dieser – von der Transfektionseffizienz unabhängige – Quotient diente als Grundlage für die Bestimmung der Promotoraktivität.

Folgende Reporterkonstrukte wurden in den hier dargestellten Experimenten verwendet:

1. Sac 2-Pro
2. 1.1-Pro

1. Zum Lysat wurde Luciferase Assay Reagens 2 zugefügt. Bei diesem ersten Schritt wurde die Lumineszenz der Firefly-Luciferase gemessen.
2. Aktivierung der Renilla-Lumineszenz durch Hinzufügen von Stop and GloTM Reagens in dasselbe Teströhrchen, indem sich schon das Luciferase Assay Reagens befand.

Zur Lumineszenzmessung verwendeten wir folgendes Luminometer: Berthold Bioluminat LB 9500.

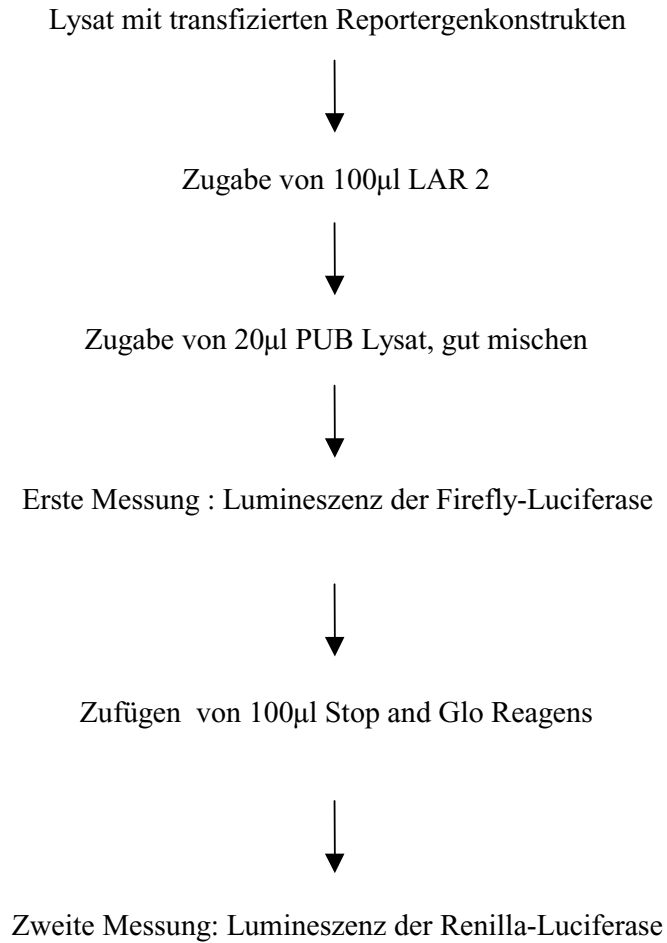


Abb. 8: Lumineszenzmessung

3. Ergebnisse

3.1. Übersicht der Ergebnisse

Versuch	Anzahl	Wirkmechanismus	Ergebnisse	Konz./Zeit
Glukose-Konzentration	6	Glukose führt als osmotisch aktive Substanz zur Zellschrumpfung; hierdurch kommt es zur Induktion der Genexpression der h-sgk.	kontinuierlicher Anstieg der Genexpression mit zunehmender Glukosekonz.	Konz.: 20/50/100mmolar
Glukose-Zeitverlauf	4	siehe oben	Anstieg der Genexpression mit zunehmender Zeit	1h/4h/8h/12h
Raffinose-Konzentration	4	siehe Glukose; Raffinose wird im Gegensatz zu Glukose nicht metabolisiert	analog zu Glukose-Konzentration	siehe Glukose
Raffinose-Zeitverlauf	4	siehe Glukose	analog zu Glukose-Zeitverlauf	siehe Glukose
Glukose-24h-Zeitverlauf	2	siehe oben	bis 8h kontinuierliche Zunahme der Expression, dann nach 16h Abnahme der Expression	2h/4h/8h/16h/24h
Glucagon-Zeitverlauf	6	Glucagon führt zur Zellschrumpfung, damit müßte die Genexpression der h-sgk abnehmen	keine eindeutige Zunahme der Expression	

Ergebnisse

Insulin- Zeitverlauf	6	durch Aktivierung des Na ⁺ /H ⁺ Austauschers, kommt es zur Zellschwellung und damit zur Abnahme der Genexpression der h-sgk	zeitabhängige Abnahme der Expression	1h/2h/4h/8h
Ionomycin/ Phorbol ester	4	Aktivierung der Proteinkinase C	Zunahme der Expression	
Nifedipin	4	relativ selektive Blockade der L-Typ Calcium-Kanäle	Abnahme der Expression	
hoe 694/ Bumetanide	4	spezifischer Inhibitor des Na ⁺ /K ⁺ /2 Cl ⁻ Cotransporters; führt hierdurch zur Zellschrumpfung und damit zur Induktion der Genexpression der h-sgk.	Zunahme der Genexpression	
Calphostin	2	sehr spezifischer Inhibitor der Proteinkinase C ; benötigt Licht zur Aktivierung	Glukose-induzierte Zunahme der Transskriptionsrate der h-sgk m-RNA wird vollständig unterbunden	
SB 202 190	2	Inhibitor der p38 MAP-Kinase; inhibiert p38 Phosphorylierung des Myelin basic Proteins	keine Inhibition der Genexpression der Kinase	
Staurosporin	4	Proteinkinase C Inhibitor	Unterbindung des durch Glukose induzierten Anstiegs der Genexpression der h-sgk	

3.2. Ergebnisse der Northern Blot Hybridisierungen

3.2.1. Induktion der h-sgk Transkription in Endothelzellen durch Glukose

Vaskuläre Endothelzellen sind im Rahmen einer diabetischen Hyperglykämie unmittelbar dem hypertonen Blutplasma ausgesetzt. Um zu überprüfen, ob die Genexpression der h-sgk in Endothelzellen durch Glukose induzierte Osmolaritätsänderungen beeinflusst wird, wurden Endothelzellen der Zelllinie h-MEC unterschiedlichen Glukosekonzentrationen ausgesetzt und für 2h inkubiert.

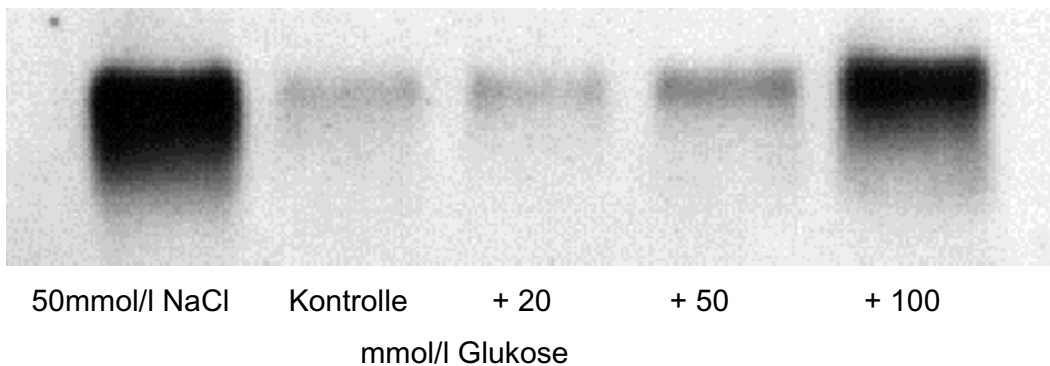


Abb. 9: Konzentrationsabhängige Induktion der h-sgk durch Glukose; nach Zugabe von 20, 50, 100mmol/l. Glukose wurde für 2h inkubiert. Als Kontrolle diente isotone Ringerlösung, als hypertones Medium NaCl in einer Konzentration von 50mmol/l.

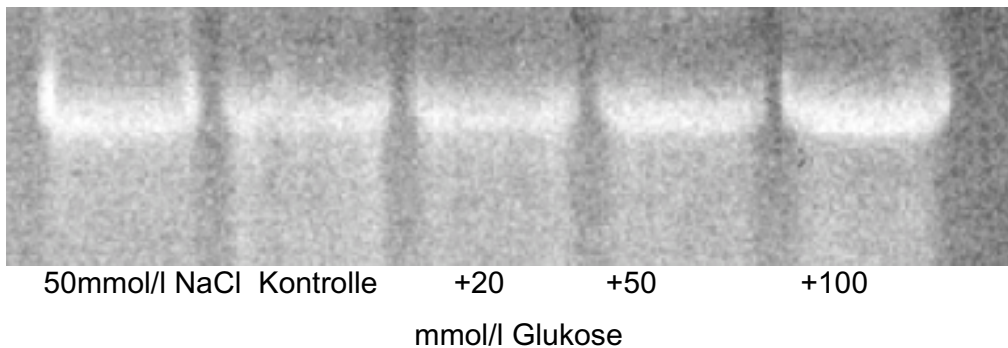


Abb. 10: Zur Vergleichbarkeit der RNA-Transkriptmengen wurden die 18 RNA-Banden mit Ethidiumbromid angefärbt. Die einheitliche Färbung bestätigt die gleichmäßige Beladung der einzelnen Spuren des Northern Blots.

Wie in Abbildung 9 gezeigt, führte die Erhöhung der Glukosekonzentration im Medium, beginnend mit einer Konzentration von 20mmol/l bis zu 100mmol/l zu einer Zunahme der h-sgk Expression.

Um zu zeigen, daß die Induktion der Genexpression der h-sgk nicht nur von der Konzentration, sondern auch von der Zeit abhängig ist, wurden die Endothelzellen einer Glukosekonzentration von 100mmol/l ausgesetzt.

Im ersten Zeitverlauf wurden die Endothelzellen für 1h, 2h, 4h und 8h in einem hyperosmolaren Medium inkubiert (siehe Abbildung 11).

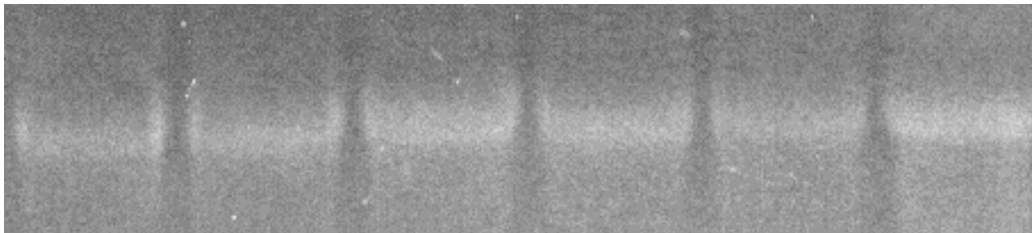
Im zweiten Zeitverlauf wurden die Endothelzellen für 24h dem hypertonen Medium ausgesetzt (siehe Abbildung 13).

Ergebnisse



50mmol/l NaCl Kontrolle 1h 2h 4h 8h

Abb. 11: Zeitabhängige Induktion der h-sgk durch Glukose. Glukose in einer Konzentration von 100mmol/l wurde zu den Endothelzellen zugegeben und für 1h, 2h, 4h und 8h inkubiert. Als hypertones Medium diente wiederum 50mmol/l NaCl.



50mmol/l NaCl Kontrolle 1h 2h 4h 8h

Abb. 12: Demonstration der gleichmäßigen Beladung der Spuren durch Ethidiumbromidfärbung der 18S-RNA-Banden.

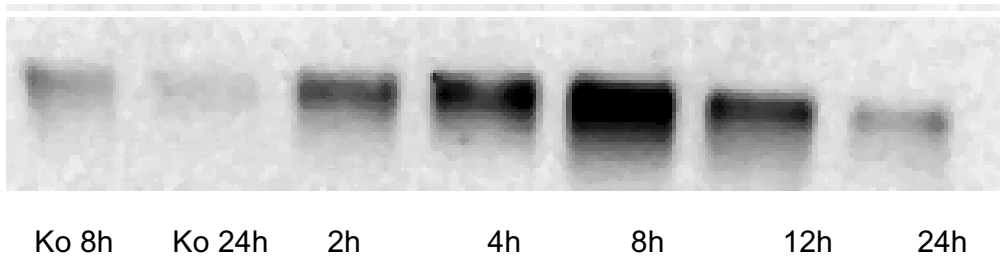


Abb.13: Endothelzellen wurden einer Glukosekonzentration von 100mmol/l für 2h, 4h, 8h und 24h ausgesetzt Als Kontrolle wurde isotone Ringerlösung zugegeben und 8h bzw. 24h inkubiert.

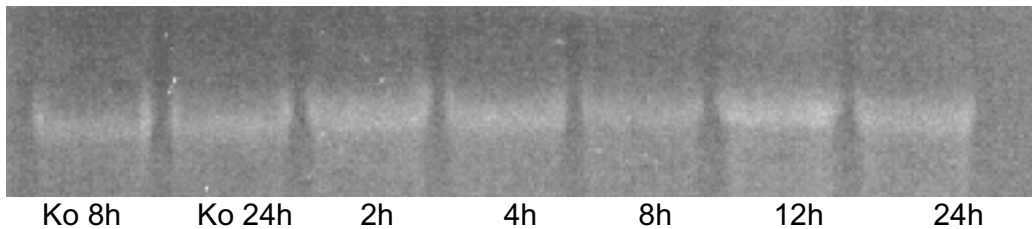


Abb.14: Demonstration der gleichmäßigen Beladung der einzelnen Spuren durch Färbung der 18S-RNA-Banden mit Ethidiumbromid.

Wie in Abbildung 11 gezeigt, ist ein erster Anstieg der Glukose induzierten h-sgk Genexpression bereits nach 2h zu erkennen. Nach einem kontinuierlichen Anstieg der Transkription, wird nach 8h das Maximum der durch Glukose induzierten Genexpression der h-sgk erreicht.

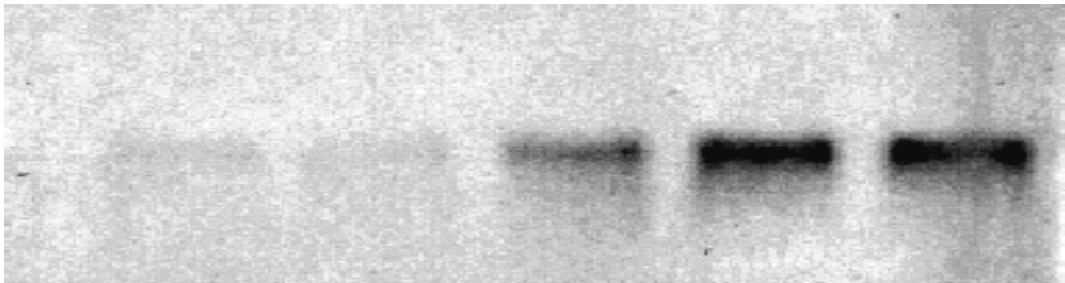
Auch beim Glukosezeitverlauf über 24h wird das Maximum der h-sgk Expression bereits nach 8h erreicht, siehe Abbildung 13. Innerhalb der folgenden 12h kehrte die Transkriptionskonzentration der h-sgk wieder auf ihren Ausgangswert zurück.

Zur Abklärung der Beteiligung metabolischer Effekte bei der Glukose-induzierten Zunahme der h-sgk Genexpression, führten wir Versuchsreihen mit dem Membran-

Ergebnisse

impermeablen Disaccharid Raffinose durch. Wir inkubierten die Endothelzellen für 2h mit Raffinose in ansteigender Konzentration von 20mmol/l bis zu 100mmol/l. Des weiteren führten wir analog zur Glukoseversuchsreihe einen Zeitverlauf mit Raffinose in einer Konzentration von 100mmol/l für 2h, 4h und 8h durch.

Sowohl im Konzentrations-, als auch im Zeitverlauf zeigte Raffinose vergleichbare Effekte auf die h-sgk Expression, so daß die Beteiligung metabolischer Effekte bei der von uns beobachteten Änderung der h-sgk Genexpression unwahrscheinlich ist.



Kontrolle +20 +50 +100 +50mmol/l
mmol/l Glukose NaCl

Abb.15: Darstellung der Konzentrationsabhängigkeit der h-sgk-Expression durch Raffinose. Dem Medium wurde Raffinose jeweils in Konzentrationen von 20, 50 und 100mmol/l zugesetzt. Als Kontrolle diente isotone Ringerlösung. Die h-sgk Induktion nach Erhöhung der extrazellulären Osmolarität um 100 mosml/l durch Zugabe von 50mmol/l NaCl ist zum Vergleich mit dargestellt.

Ergebnisse

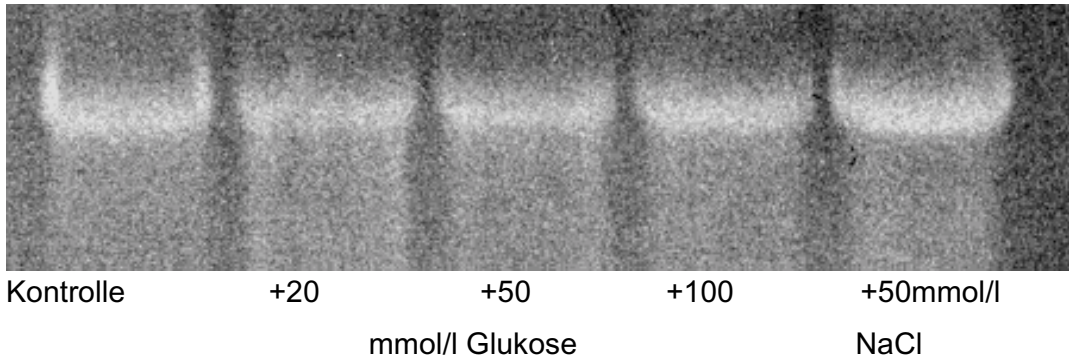


Abb.16: Die gleichmäßige Beladung der einzelnen Spuren des Northern Blots werden durch die vergleichbare Anfärbung der ethidiumbromidgefärbten 18S-RNA-Banden demonstriert.

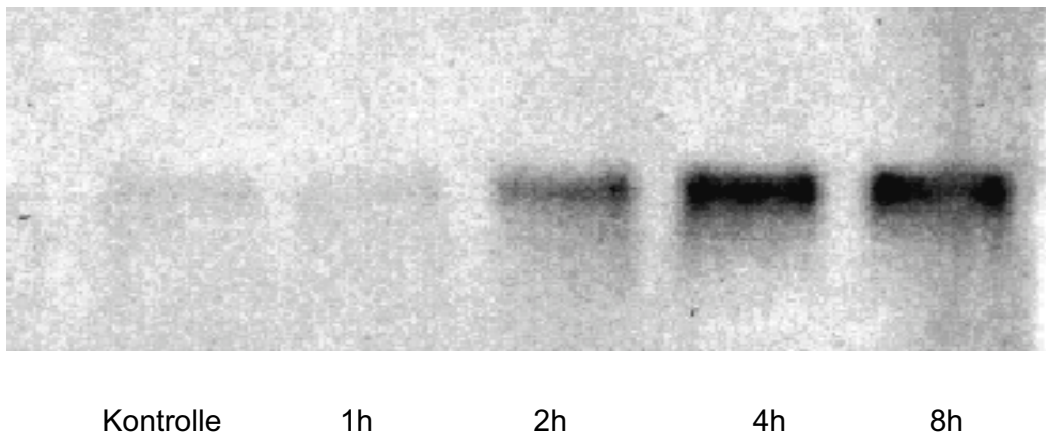


Abb.17: Nach Zugabe von 100mmol/l Raffinose ins Medium und Inkubation für jeweils 1h, 2h, 4h und 8h lässt sich ein kontinuierlicher Anstieg der h-sgk-Expression beobachten, analog zu den Ergebnissen im Glukosezeitverlauf.

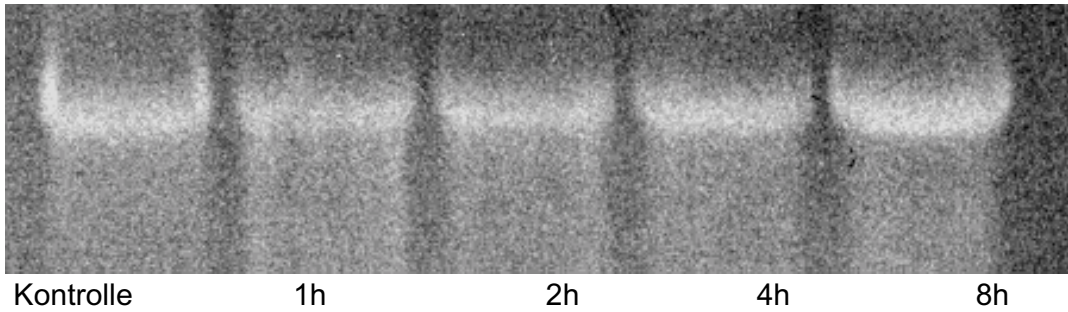
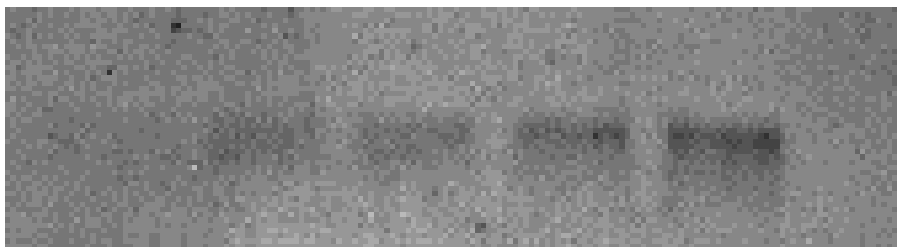


Abb.18: Demonstration der gleichmäßigen Beladung der einzelnen Spuren des Northern Blots durch Anfärbung der 18S-RNA-Banden mit Ethidiumbromid.

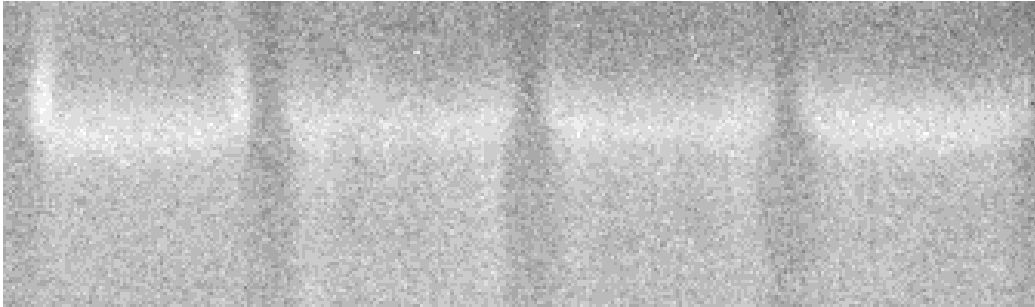
Zur Analyse des Signaltransduktionsweges der h-sgk untersuchten wir eine mögliche Beteiligung der Proteinkinase C. Diese weist innerhalb ihrer katalytischen Domäne eine hohe Sequenzhomologie mit der humanen Serin/Threoninkinase sgk auf. Dies kann möglicherweise erklären, weshalb sich Hemmung, bzw. Aktivierung der Proteinkinase C auf die Genexpression der h-sgk auswirken.

Es war uns möglich, die Proteinkinase C mittels des Inhibitors Staurosporin und des PKC-spezifischen Inhibitors Calphostin zu hemmen und dadurch, die durch Glukose induzierte Zunahme der Genexpression der h-sgk, vollständig zu unterbinden.



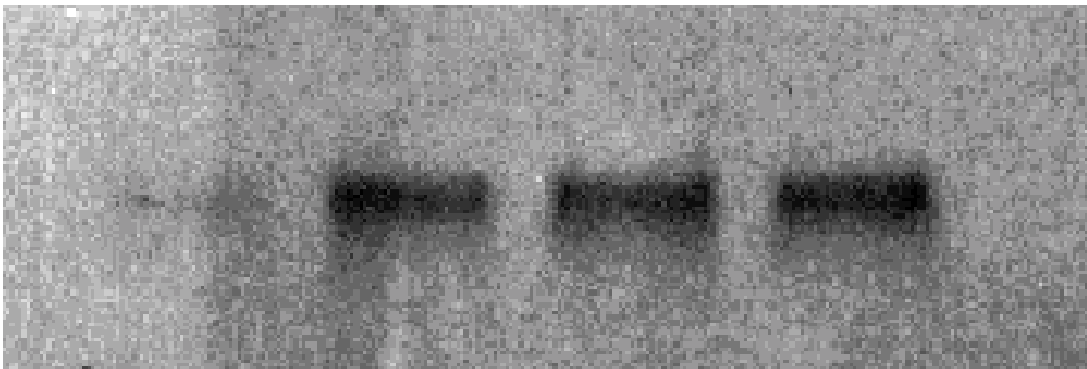
Kontrolle Glukose Calphostin Glukose+ Calphostin

Abb.19: Hemmung der Proteinkinase C durch Zugabe des spezifischen PKC-Inhibitors Calphostin und Inkubation für 2h. Vor Zugabe von Calphostin wurden die Proben 20 min im Brutschrank äquillibriert, anschließend wurde Calphostin zugegeben und 2 min UV bestrahlt. Glukose in einer Konzentration von 100mmol/l wurde danach zugefügt.



Kontrolle Glukose Calphostin Glukose+Calphostin

Abb.20: Nachweis der gleichmäßigen Beladung der Spuren durch Ethidiumbromidfärbung der 18S-RNA Banden



Kontrolle Glukose Staurosporin Glukose 100mmol/l
100mmol/l 100nmol/l +Staurosporin 100nmol/l

Abb. 21: Hemmung des durch Glukose induzierten Anstiegs der h-sgk durch den PKC-Inhibitor Staurosporin. Vor Zugabe von Glukose wurde 2h mit Staurosporin vorinkubiert. Als Kontrolle diente isotone Ringerlösung.

Ergebnisse

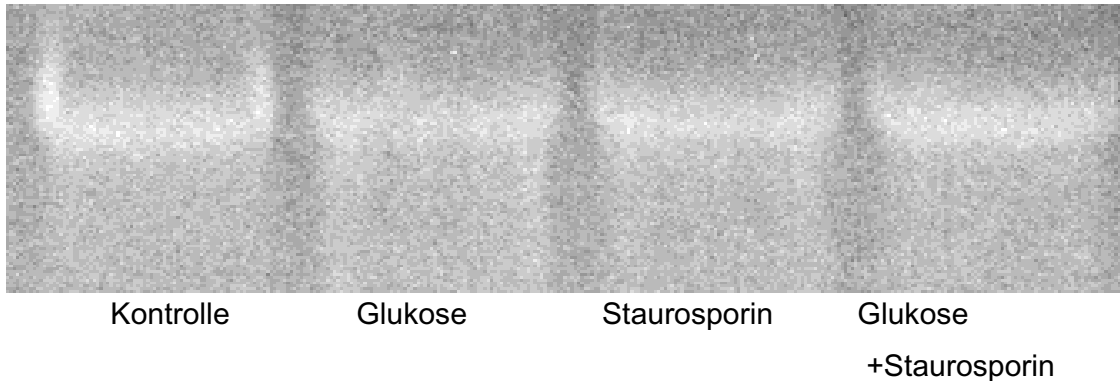
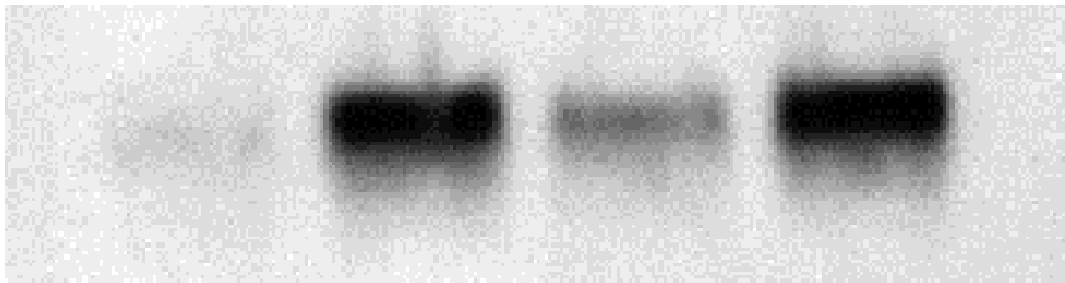


Abb.22: Demonstration der gleichmäßigen Beladung der einzelnen Spuren durch Färbung der 18S-RNA-Banden mit Ethidiumbromid.

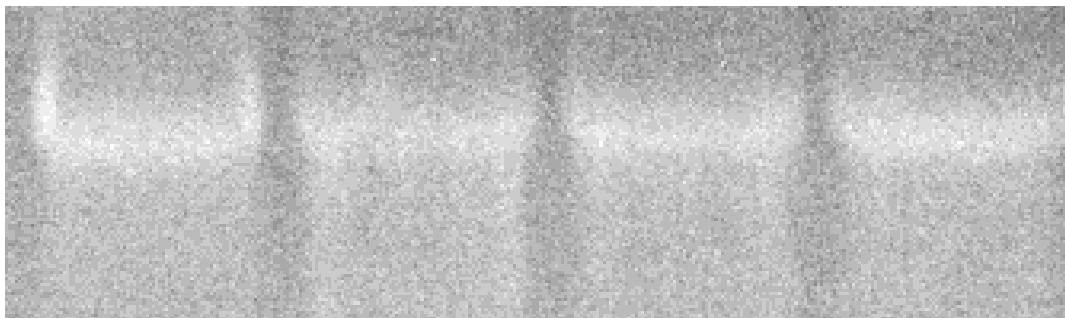
Abbildung 21 zeigt die Expressionssteigerung der h-sgk unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von Staurosporin, in einer Konzentration von 100 nmol/l. Die zweistündige Vorinkubation mit Staurosporin führte zwar schon per se zu einer Zunahme des h-sgk Signals aber die Zugabe von Glukose (100mmol/l) konnte zu keiner weiteren Steigerung der Expression der h-sgk führen.

Aktivierung der Proteinkinase C durch Phorboldidecanoat (100 nmol/l) und Ionomycin (1 μ mol/l), das zur Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration führt, bewirkten einen Anstieg der h-sgk Genexpression innerhalb von 2h Inkubationszeit.



Kontrolle Ionomycin Phorboldidecanoat PDD+Ionomycin

Abb. 23: Induktion der h-sgk durch Aktivierung der Proteinkinase C. Nach Zugabe von Ionomycin und PDD wurde für 2h inkubiert. Zur Kontrolle wurde isotone Ringerlösung verwendet.



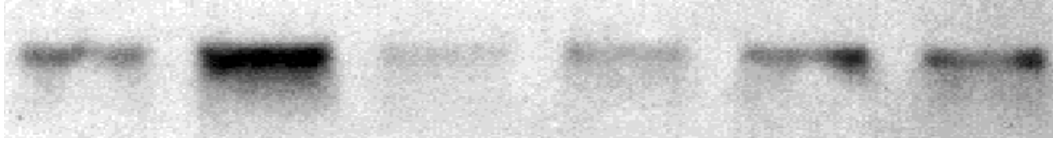
Kontrolle Ionomycin PDD Ionomycin+PDD

Abb.24: Die einheitliche Ethidiumbromidfärbung der 18S-RNA-Banden weist die gleichmäßige Beladung der einzelnen Spuren des Northern Blots nach.

Wie Abbildung 12 zeigt, führten sowohl Ionomycin, als auch PDD zu einer deutlichen Zunahme der Expression der h-sgk, im Vergleich zur Kontrollbedingung. Diese Ergebnisse legen nahe, daß die Proteinkinase C, ebenso wie die intrazelluläre Calciumkonzentration, eine wichtige Rolle für den Signaltransduktionsweg der h-sgk spielen.

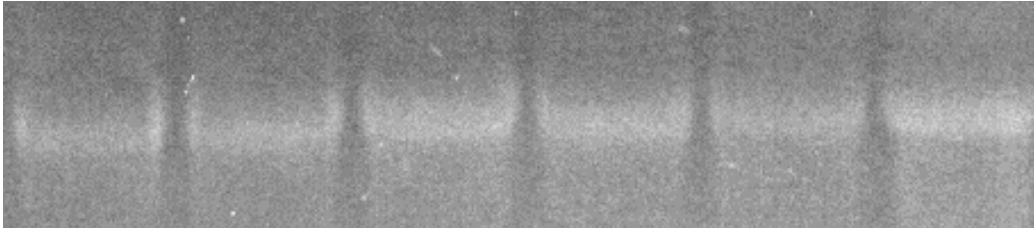
Die bei den oben beschriebenen Experimenten beobachtete Dominanz der Calcium-Wirkung wurde untermauert durch Befunde, die zeigten, daß durch unspezifische Blockade des Calciumeinstroms mit 10 beziehungsweise 100 $\mu\text{mol/l}$ Nifedipin die Glukose-abhängige h-sgk Induktion in den Endothelzellen unterbunden werden konnte.

Ergebnisse



Kontrolle	Glukose	Nifedipin	Nifedipin	Glukose	Glukose
	100mmol/l	10µmol/l	100µmol/l	+Nifedipin	+Nifedipin
				10µmol/l	100µmol/l

Abb.25: Hemmung des durch Glukose induzierten Anstiegs der h-sgk durch Nifedipin. Glukose in einer Konzentration von 100mmol/l und Nifedipin in Konzentrationen von 10µmol/l und 100µmol/l wurden für jeweils 2h inkubiert. Als Kontrolle diente isotone Ringerlösung.



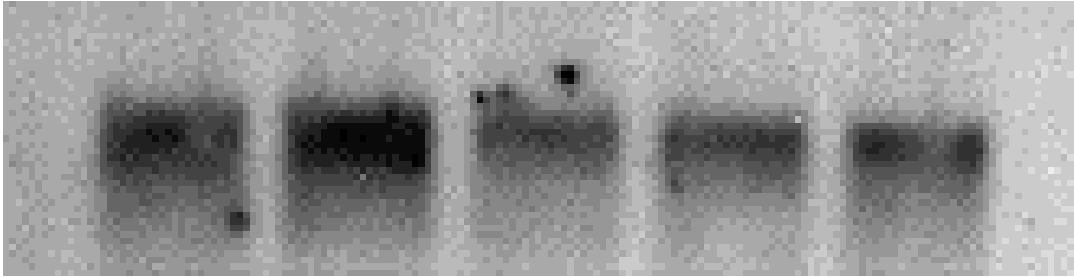
Kontrolle	Glukose	Nifedipin	Nifedipin	Glukose	Glukose
		10µmol/l	100µmol/l	+Nifedipin	+Nifedipin
				1µmol/l	100µmol/l

Abb.26: Nachweis der gleichmäßigen Beladung der einzelnen Spuren mit Hilfe von ethidiumbromidgefärbten 18S-RNA-Banden.

Wie Abbildung 25 zeigt, führte Nifedipin zu einer deutlichen Hemmung der Expression der h-sgk nach Zugabe von Glukose, in einer Konzentration von 100mmol/l.

Ergebnisse

Insulin führt durch Aktivierung des Natrium/Protonenaustauschers und des NaCl/KCl-Kotransporters zur Zellschwellung. Diese Zellschwellung wiederum führt zu einer Abnahme der Expression der h-sgk. Die durch Insulin induzierte Expressionsabnahme der h-sgk ist zeitabhängig, (Abbildung 27).



Kontrolle

1h

2h

4h

8h

Abb. 27: Durch Insulin induzierte Expressionsabnahme der h-sgk. Insulin in einer Konzentration von 16nmol/l wurde für 1h, 2h, 4h und 8h inkubiert. Als Kontrolle diente wiederum isotone Ringerlösung.

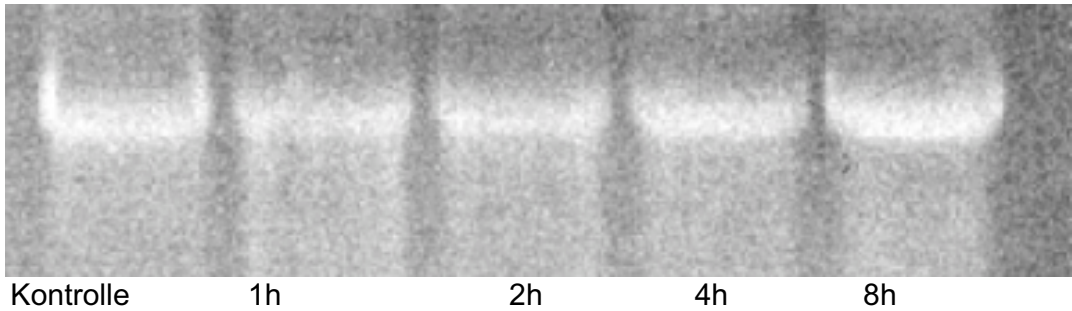


Abb. 28: Nachweis der gleichmäßigen Beladung der Spuren durch Färbung der 18S-RNA-Banden mit Ethidiumbromid

Im Gegensatz dazu führt Glukagon zu einer Zellschrumpfung, was wiederum zu einer Zunahme der Expression der h-sgk führen könnte. Analog zu Insulin wurden die Endothelzellen für 1h, 2h, 4h, 8h mit 100mmol/l Glukagon inkubiert.

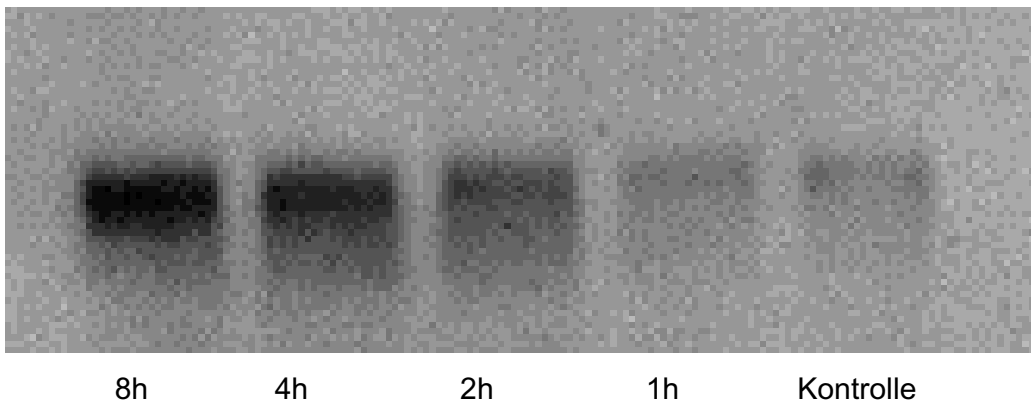


Abb.29: Die Transkriptionsrate der m-RNA der h-sgk wurde durch Inkubation mit Glukagon für 1h, 2h , 4h und 8h nicht beeinflusst. Sie blieb im Vergleich zur Kontrollbedingung unverändert.

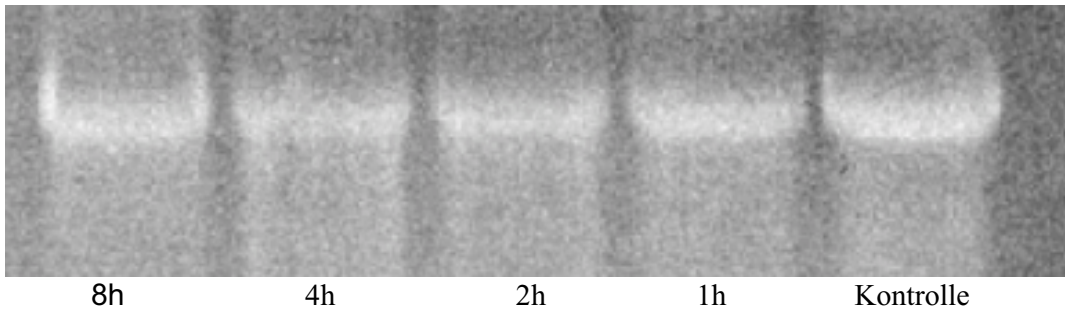
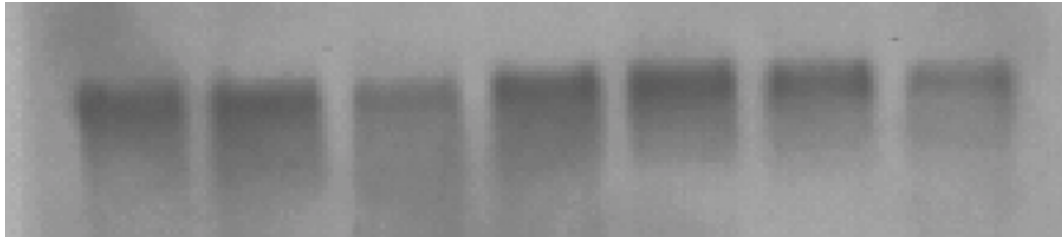


Abb.30: Ethidiumbromidgefärbte 18S-RNA-Banden zum Nachweis der gleichmäßigen Beladung der einzelnen Spuren

Wie Abbildung 29 zeigt, ließ sich keine eindeutige zeitabhängige Zunahme der Expression der h-sgk feststellen. Zur Bestätigung unserer Ergebnisse mit Insulin als Aktivator des Na^+/H^+ Austauschers und des $\text{Na}^+/\text{K}^+ / 2 \text{Cl}^-$ Cotransporters setzten wir die Endothelzellen HOE 694 und Bumetanide für jeweils 2h aus.

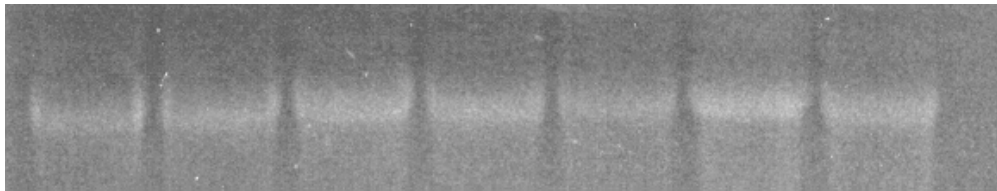
Bumetanide ist ein spezifischer Inhibitor des $\text{Na}^+/\text{K}^+ / 2 \text{Cl}^-$ Cotransporters und HOE 694 führt zur Hemmung des Na^+/H^+ Austauschers.

Nach Blockade beider Transportsysteme sollte die Zellschwellung unterbunden werden und man würde eine Zunahme der Expression der h-sgk erwarten.



Kontrolle Hoe 694 Bumetanide Glukose Hoe 694+ Bum. + Hoe. +
Glukose Glukose Bum.+ Gluk.

Abb. 31: Zugaben in das Medium von Glukose in einer Konzentration von 100mmol/l, Bumetanid 10 μ mol/l, HOE 694 10 μ mol/l; Inkubation für 2 Stunden.



Kontrolle Hoe 694 Bumetanid Glukose Hoe 694 Bum. Hoe 694
+Glukose +Gluk. +Gluk.+Bum.

Abb.32: Demonstration der einheitlichen Ladung der einzelnen Spuren mittels Ethidiumbromidfärbung der 18S-RNA-Banden.

Wie Abbildung 32 zeigt, führen sowohl HOE 694, als auch Bumetanid zu einer eindeutigen Zunahme der Expression der h-sgk. Sowohl HOE 694, als auch das Schleifendiuretikum Bumetanid hemmen den NaCl/KCl-Kotransporter und den Natrium-Protonenaustauscher. Dadurch wird zum einen die Insulin induzierte Zellschwellung verhindert, als auch bei Nichtvorhandensein von Insulin, eine Zellschrumpfung induziert. Diese wiederum ist ein adäquater Stimulus zur Erhöhung

Ergebnisse

der Transkriptionsrate der h-sgk m-RNA. Somit läßt sich die Zunahme der h-sgk Expression bei Applikation von HOE 694 und Bumetanid erklären.

Um einen weiteren möglichen Schritt in der Signaltransduktionskaskade zu beleuchten, untersuchten wir, ob die p-38 Kinase eine Rolle bei der intrazellulären Signaltransduktion für die transkriptionelle Regulation der h-sgk spielt.

Die MAP-Kinasen werden unabhängig von der Proteinkinase C und intrazellulärem Calcium durch osmotische Zellvolumenänderung aktiviert (Schliess, et al. 1995). Wir verwendeten SB 202 190, einen spezifischen Inhibitor der p-38 Kinase.

Sollte die p-38 Kinase eine bedeutende Rolle in der Signaltransduktionskaskade der h-sgk spielen, dann müßte aus deren Hemmung eine Abnahme der Expression der h-sgk resultieren.

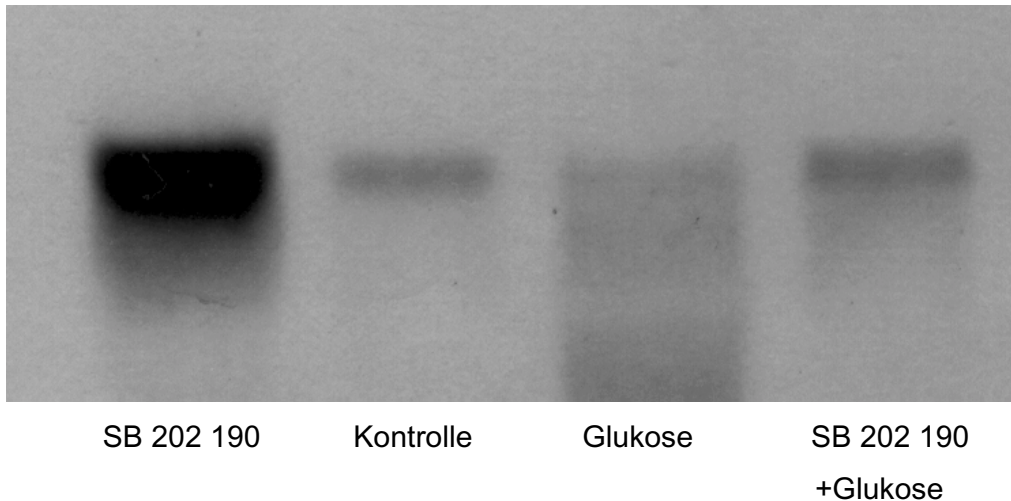


Abb.33: Glukose wurde vor Zugabe ins Medium 15 min äquilibriert und anschließend gemeinsam mit SB 202 190, in einer Konzentration von 30µmol/l für 8h inkubiert. SB 202 190 wurde vor Zugabe ins Medium für 2h vorinkubiert. Die Glukosekonzentration betrug 100mmol/l.

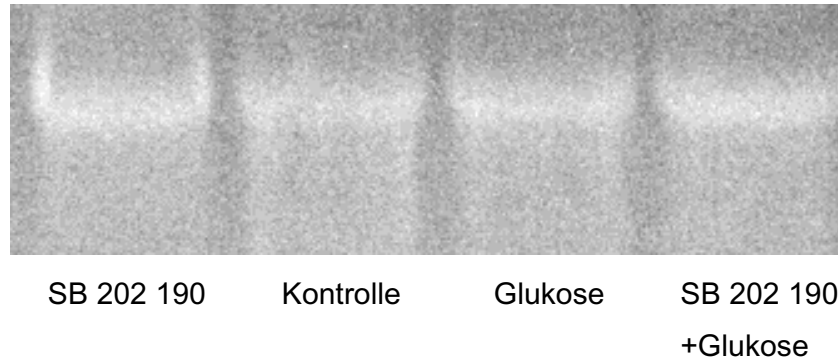


Abb.34: Nachweis der gleichmäßigen Beladung der einzelnen Spuren des Northern Blots durch Färbung der 18S-RNA-Banden mit Ethidiumbromid.

Wie Abbildung 33 zeigt, wird die Glukose-induzierte Zunahme der h-sgk m-RNA Transkriptkonzentration durch die Hemmung der p-38 Kinase nicht beeinträchtigt, was dafür spricht, daß der p-38 Kinase im Glukose-induzierten Signaltransduktionsweg zur Regulation der h-sgk keine entscheidende Rolle zukommt.

3.3 Analyse der basalen und der stimulierten Promotoraktivität eines h-sgk Promotorkonstrukts

Die Aktivität einer isolierten Promotorsequenz und deren Ansprechbarkeit auf hypertone bzw. anderweitig das Zellvolumen beeinflussende Stimuli (Glukose 100mmol/l; NaCl 50mmol/l; TGF- β), wurde mit Hilfe von Reportergenkonstrukten in Endothelzellen getestet.

Die Konstrukte (*Sac II Pro und 1.1 Pro*) wurden in Endothelzellen transfiziert, die nach Transfektion für jeweils 6h bzw. 12h mit Glukose, NaCl und TGF- β inkubiert wurden.

Ergebnisse

Nach der Stimulation wurden die Zellen lysiert und die Aktivität der Luciferase gemessen.

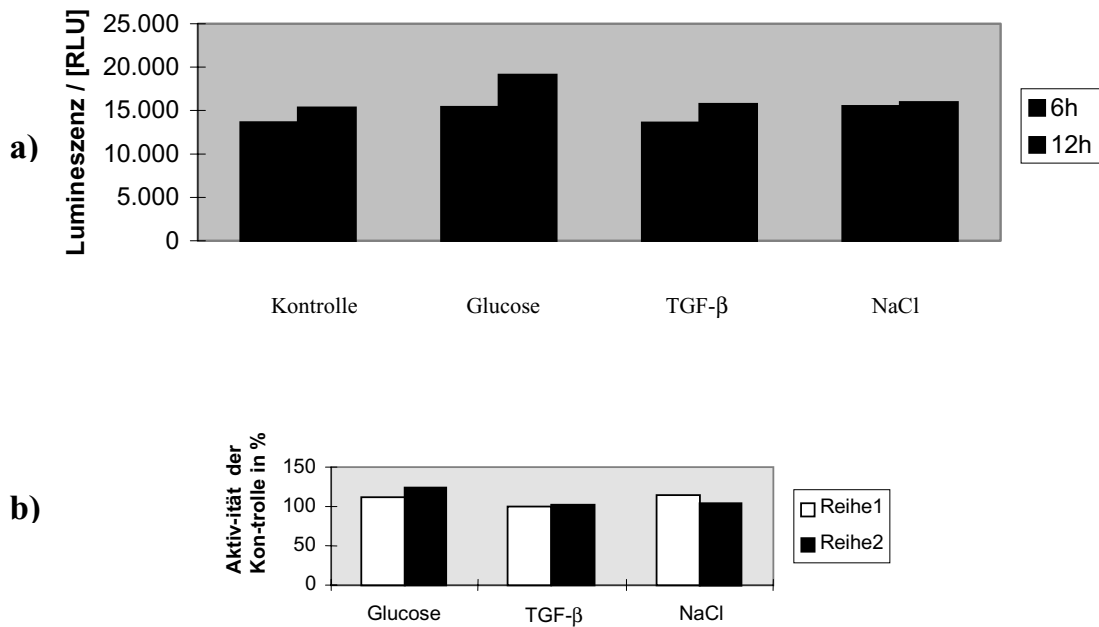


Abb. 35: Analyse der Promotoraktivität (a), Analyse der Promotoraktivität in bezug zur Aktivität der Kontrollen (b)

Im Vergleich zur basalen Aktivität des Promotors (Ko), entsprach die Aktivität nach 6- bzw. 12 stündiger Inkubation mit Glukose (100mmol/l) 113% bzw. 125% des basalen Ausgangswertes.

Nach Inkubation mit Natriumchlorid erhöhte sich die Lumineszenz auf 114% (6h Inkubation) und 104% (12h) des Ausgangswertes. Die Messung nach Inkubation mit TGF- β für 6h/12h entsprach 99.8%/103% der basalen Aktivität des Promotors.

In der zweiten Abbildung ist die Promotoraktivität in bezug zur Aktivität der Kontrollen dargestellt. Reihe 1 entspricht hierbei einer Inkubationszeit von 6h, Reihe 2 einer Inkubationszeit von 12h.

Ergebnisse

Man kann erkennen, daß die Aktivität des Promotors nicht wesentlich erhöht ist, im Vergleich zu den Aktivitäten der jeweiligen Kontrollen (entsprechen in der Darstellung 100%). Für Glucose bedeutet das einen Anstieg um das 1.13fache (1.25fache), für TGF- β einen Anstieg um das 0.998fache (1.03fache), für NaCl einen Anstieg um das 1.14fache (1.04fache). Vor den Klammern jeweils der 6h Inkubationswert, in Klammern der Wert nach 12-stündiger Inkubationszeit.

Ergebnisse

4. Diskussion der Ergebnisse

4.1 Mögliche Signaltransduktionswege und Stimuli der h-sgk Genexpression

4.1.1 Veränderungen der Osmolarität

Das h-sgk Gen nimmt innerhalb der Gruppe der transkriptionell regulierten Gene eine Sonderstellung ein, insofern als dessen Transkription nicht nur durch Veränderungen des Zellvolumens durch Änderungen der Osmolarität, als auch durch alleinige Änderungen des Zellvolumens bei gleichbleibender Osmolarität reguliert wird. Die Induktion der h-sgk Genexpression durch Änderung des Zellvolumens ohne Änderung der Osmolarität wird unter 4.1.2 abgehandelt.

Wir konnten in unseren Versuchsreihen an Endothelzellen nachweisen, daß Veränderungen der Osmolarität ein starker Stimulus zur Induktion der h-sgk Genexpression ist. So besteht sowohl eine Zeit-, als auch Konzentrationsabhängige Induzierbarkeit der h-sgk m-RNA Transkription durch Glukose. Ein erster Anstieg der Transkriptionskonzentrationserhöhung findet sich nach 2h, ein Maximum wird nach 8h erreicht und im 24h-Glukosezeitverkauf findet sich ein Rückgang auf das Ausgangsniveau der Transkriptionskonzentration der h-sgk m-RNA nach 16h. Auffällig ist hierbei, daß es erst nach 2h zu einer deutlichen Zunahme der Genexpression der h-sgk kommt. Zu diesem Zeitpunkt müßte das Zellvolumen durch die Aktivität verschiedener Volumen-regulatorischer Mechanismen (RVI) bereits wieder zum Ausgangswert zurückgegangen sein. Allerdings ist bekannt (Häussinger et al., 1994), daß Zellen nach hypertoner Exposition ihr Volumen zwar zum isotonen Zustand hin regulieren, jedoch daß es ihnen nicht möglich ist, ihr ursprüngliches Volumen wieder vollkommen zurückzuerlangen. Ein Mechanismus für die scheinbar verpätete Reaktion

der h-sgk Genexpression auf das veränderte Zellvolumen könnte „Makromolekulares Crowding“ darstellen. Hierunter versteht man die intrazelluläre Packungsdichte von Proteinen. Bei Zellschrumpfung erhöht sich die Proteinpackungsdichte und kann als Mediator zur Genexpression dienen (Minton et al., 1992).

Ebenso konnten wir nachweisen, daß die Glukose-abhängige Genexpression der h-sgk unabhängig ist von intrazellulären Stoffwechselwirkungen der Glukose, indem wir zu gleichen Bedingungen Versuchsreihen mit dem nicht-membranpermeablen Disaccharid Raffinose durchführten. Analog zu den Ergebnissen mit Glukose führte auch Raffinose zu einer Zeit- und Konzentrationsabhängigen Induktion der h-sgk Genexpression in Endothelzellen. Daher schließen wir, daß die durch Glukose induzierte Veränderung des Zellvolumens und die damit verbundene Änderung der Transkriptionskonzentration der h-sgk nicht von Stoffwechselwirkungen der Glukose abhängig ist.

Einen weiteren Beleg für die Zellvolumenabhängige Genexpression der h-sgk liefert die Induktion der Genexpression durch Zugabe von Bumetanid und HOE 694. Bumetanid gehört zur Klasse der Schleifendiuretika und inhibiert den NaCl/KCl-Kotransporter, HOE 694 inhibiert den Natrium-Protonenaustauscher. Durch Inhibition beider Transportsysteme wird sowohl die durch Insulin induzierte Zellschwellung unterbunden (Schliess et al., 2000), als auch bei Nichtvorhandensein von Insulin eine Abnahme des Zellvolumens induziert. Diese Zellschrumpfung führte wiederum zu einer Zunahme der Transkriptionskonzentration der h-sgk m-RNA. Diese Resultate finden sich nicht nur in h-MEC Endothelzellen, sondern auch in intestinalen Zellen (Waldegger et al., 1999), Pankreaszellen (Klingel et al., 2000) und Leberzellen (Waldegger et al., 2000). Dies deutet darauf hin, daß die Volumen-sensitive Regulation der h-sgk Genexpression mit einer Vielzahl an metabolischen Funktionen assoziiert sein könnte.

Die oben benannten Ergebnisse belegen, daß Änderungen der Osmolarität und damit verbundene Änderungen der Zellvolumenhomöostase eindeutig in die Regulation der h-sgk Genexpression eingreifen. Die weiteren Unterkapitel der Diskussion werden mögliche Signaltransduktionswege von der Veränderung des Zellvolumens bis zur Induktion der h-sgk Genexpression aufgreifen.

4.1.2 Veränderungen des Zellvolumens

Insulin

Eine der wichtigsten metabolischen Wirkungen des Insulins ist die Glukoseaufnahme in die Zellen des Zielgewebes. Die in der Zielzelle vermittelten Stoffwechselwirkungen werden unter anderem durch Veränderungen des Zellvolumens erreicht. Hierbei agiert das Zellvolumen als „second messenger“ zwischen Insulin und Stoffwechselwirkung, z.B. Glykogensynthese (Kayali et al., 2000). Insulin bewirkt eine Zunahme des Zellvolumens durch vermehrten Kaliumeinstrom in das Zellinnere. Dies wird erreicht durch Aktivierung des NaCl/KCl-Kotransporters, des Natrium-Protonen-Austauschers und der Natrium-Kalium-ATPase (Vom Dahl et al., 1991).

Da unser Interesse dem Signaltransduktionsweg der Zellvolumen-sensitiven Kinase h-sgk gilt, ist die über Insulin vermittelte Veränderung des Zellvolumens und die damit verbundene mögliche Beeinflussung der Transkriptionsrate der h-sgk m-RNA von großer Bedeutung. Eine wichtige Frage in diesem Zusammenhang ist, wie vermittelt Insulin seine metabolische Wirkung über das veränderte Zellvolumen oder anders formuliert, wie sieht der Signaltransduktionsweg der insulinvermittelten Änderung des Zellvolumens aus und welche Rolle nimmt hierbei die humane Serin/Threoninkinase h-sgk ein?

Zahlreiche Untersuchungen konnten nachweisen, daß Insulin ebenso wie osmotischer Schock oder Streß zur Aktivierung von Mitogen aktivierten Kinasen führt. Eine Schlüsselrolle bei der Insulin-induzierten Aktivierung der MAP-Kinasen nimmt hierbei die Phosphatidylinositol-3-kinase (PI 3-kinase) ein (Marandi et al., 2001). Ebenso konnte erwiesen werden, daß im Signaltransduktionsweg vom Insulinrezeptor bis auf die Ebene der aktivierten Proteinkinasen und Proteinphosphatasen dem zyklischen Prostaglandininositolphosphat (cyclic PIP) eine entscheidende Bedeutung beizumessen ist (Gypakis et al., 2000). Somit wird die Wirkung von Insulin in der Zielzelle sowohl über PIP, als auch über die PI-3-kinase vermittelt. Der weitere Transduktionsweg führt zur Aktivierung verschiedener MAP-Kinasen (Avruch et al., 2001). Hierbei wurde die

Aktivierung von JNK über ras postuliert (Fukunaga et al., 2000), die Aktivierung der p38 Kinase (Kayali et al., 2000; Fukunaga et al., 2000) und die Aktivierung der ribosomalen Kinasen p70/S6 über die Proteinkinase B (Marandi et al., 2001). Die Tatsache, daß sowohl osmotischer Schock, als auch Insulin zur Aktivierung der oben benannten Kinasen führen, die nachweislich mit Fibrosierung und Zellschädigung in Verbindung gebracht werden, legt nahe, daß hohe Glukosespiegel und die damit verbundene Aktivierung der Insulinsignaltransduktionskaskade zu zellulären Schäden führen könnte.

In unseren Ergebnissen konnten wir eine zeitlich abhängige Verringerung der h-sgk Genexpression unter Einwirkung von Insulin nachweisen. Dies steht am wahrscheinlichsten in Zusammenhang mit der durch Insulin induzierten Veränderung des Zellvolumens. Die Aktivierung verschiedener Transportersysteme durch Insulin und die damit verbundene Erhöhung des KaliumEinstroms in die Zelle, führt zur Zunahme des Zellvolumens. Die Serin/Threoninkinase h-sgk ist in ihrer Genexpression nachweislich beeinflussbar durch Veränderungen des Zellvolumens. So konnte gezeigt werden, daß eine Zunahme des Zellvolumens zu einer Verminderung der Transkriptionsrate der h-sgk m-RNA führt (Waldegger et al., 1997). Eine weitere Regulation der h-sgk Genexpression durch Insulin könnte durch den gemeinsamen Signaltransduktionsweg über die MAP-Signaltransduktionskaskade erklärt werden. Allerdings steht hierzu im Gegensatz, daß die Inhibition des ras-Proteins zu einer Abnahme der h-sgk Transkriptkonzentration führt (Waldegger 1998), hingegen Insulin über Aktivierung der PI-3-kinase zu einer Aktivierung von ras führt. Die genauen Zusammenhänge zwischen der Insulinwirkung über die MAPK-Signaltransduktionskaskade und der möglichen Beeinflussung der h-sgk Transkriptkonzentration durch den MAPK-Signaltransduktionsweg bleiben ungeklärt.

Glukagon

Glukagon reguliert eine Vielzahl an heptozellulären Funktionen. So ist es unter anderem verantwortlich für den katabolen Leberstoffwechsel, indem es die Glykogenolyse,

Proteolyse und Lipolyse stimuliert und gleichzeitig die Synthese von Fettsäuren, Cholesterin inhibiert. Außerdem antagonisiert Glukagon zahlreiche Insulinwirkungen auf die Zelle, wie z. B. die durch Insulin induzierte Zunahme des Zellvolumens (Schliess et al., 2000). Die hepatische Proteolyse wiederum ist unter Kontrolle des Leberzellvolumens. Die antiproteolytische Wirkung von Insulin auf die Hepatozyten ist assoziiert mit einer Zunahme des Kaliumeinstroms in die Zelle. Die Hemmung der Proteolyse nach hypoosmotischer Zellschwellung wird begleitet vom Ausstrom intrazellulären Kaliums (Vom Dahl et al., 1991). Die Auswirkungen des Glukagons auf das Leberzellvolumen und damit auf die Leberzellfunktion (Proteolyse) legen nahe, daß die sich antagonisierenden Wirkungen von Insulin und Glukagon auf die hepatische Proteolyse hauptsächlich durch deren Auswirkung auf das Leberzellvolumen erklärt werden können. Das Zellvolumen agiert hiermit als „second messenger“ in der Signaltransduktionskaskade der Glukagonwirkung auf die Leberzelle.

Wie führt Glukagon nun zu einer Veränderung des Leberzellvolumens und welche Auswirkung hat das veränderte Zellvolumen auf die von uns untersuchte humane Serin/Threoninkinase sgk?

Die Bindung von Glukagon an den Plasmamembranrezeptor induziert die Erhöhung von intrazellulärem cAMP und Calcium (Jelinek et al., 1993). In der Leber führen Glukagon und cAMP zur Zellschrumpfung, indem es zum Ausstrom von intrazellulären Ionen, z. B. Kalium kommt (Häussinger et al., 1992), ebenso aktiviert Glukagon die Natrium-Kalium-ATPase (Häussinger et al., 1995). Schliess et al., 2000 konnten nachweisen, daß Glukagon über cAMP zur Aktivierung der JNK und der p38 Kinase führen kann. Neuere Studien konnten belegen, daß die Kinetik der MAP Kinasen Aktivierung in direktem Zusammenhang mit der Stoffwechselwirkung stehen (Tombes et al., 1998). Eine Beteiligung der MKP-1 bei der durch das Zellvolumen medierten Wirkung des Glukagons auf hepatozelluläre Stoffwechselwirkungen liegt nahe.

In unseren Ergebnissen führte Glukagon zu keiner Veränderung der Transkriptionsrate der h-sgk m-RNA. Dies widerspricht unseren Erwartungen, da Glukagon durch Aktivierung von Kationenkanälen zur Zellschrumpfung führt (Lang et al., 1998), Zellschrumpfung wiederum eine Zunahme der h-sgk Genexpresion bewirkt (Waldegger

et al., 1997). Deshalb hätten wir eine Zunahme der h-sgk Transkriptkonzentration erwartet. Hingegen konnten wir in unseren Ergebnissen keine eindeutige Zunahme der Transkriptkonzentration der h-sgk verzeichnen. Im Vergleich zur Kontrollsituation mit isotoner Ringerlösung war kein deutlicher Unterschied sichtbar.

Zur Diskussion stehen eine mögliche Antagonisierung des h-sgk induzierenden Effekts der Zellvolumenabnahme durch eventuelle Auswirkungen der MKP-1 Signaltransduktionskaskade auf die Glukagon-vermittelte Zellvolumenänderung. Ebenso könnte die durch Glukagon vermittelte Verminderung des Zellvolumens zu gering sein, um eine Induktion der h-sgk Genexpression auszulösen. Diese These verfestigen Ergebnisse von Hallbrucker et al., 1991, die von einer nur äußerst geringen Zellschrumpfung durch Glukagon berichten.

4.1.3 Signaltransduktionswege der h-sgk

Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration

Ein mögliches Bindeglied in der Signaltransduktionskaskade der Glukose-abhängigen Induktion der h-sgk Genexpression stellt eine Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration dar. Die Rolle des intrazellulären Calciumspiegels bei der Vermittlung zwischen extrazellulärer Hypertonizität und nachfolgender Zunahme der h-sgk m-RNA Transkriptionsrate wird untermauert (Tinel et al., 2000; Souza et al., 2000) durch die Beteiligung von Calcium an der RVD (regulatory volume decrease). Hierunter versteht man Mechanismen, die nach Zellschwellung zur Wiederherstellung der ursprünglichen Zellgröße beitragen.

Die Verminderung des Zellvolumens, die durch erhöhte extrazelluläre Osmolarität induziert wird aber ebenso durch Rückgang des ursprünglich erhöhten Zellvolumens im Rahmen der regulatorischen Zellvolumenabnahme (RVD), ist ein adäquater Stimulus zur Induktion der h-sgk Genexpression. Desgleichen wurde beschrieben, daß zur Regulation des Zellvolumens Calcium ein notwendiger Faktor ist. Calcium dient somit

als ein intrazelluläres Signal für die zelluläre Volumenregulation als Antwort auf veränderte extrazelluläre osmotische Bedingungen (Goddard et al., 2000).

Die Frage stellt sich nun nach der Art der Mechanismen, die über Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels in der Signaltransduktionskaskade der h-sgk Genexpression eine Rolle spielen könnten.

Zum einen ist es wahrscheinlich, daß eine direkte Beeinflussung der L-Typ Calciumkanäle zur Zunahme der intrazellulären Calciumkonzentration führt. Cirillo et al., 1998 und Kamp et al., 2000 berichten über eine Regulation der L-Typ Calciumkanäle durch die Proteinkinase C. Dieser spannungsabhängige Calcium-einstrom ist nachweislich Nifedipin-sensitiv. Das heißt, eine Hemmung der L-Typ Calciumkanäle mit dem Calciumkanalblocker Nifedipin führt zur Aufhebung des Calciumeinstroms über die L-Typ Calciumkanäle.

Auch in unseren Versuchsreihen konnten wir nachweisen, daß eine Hemmung der L-Typ Calciumkanäle mit Nifedipin zur vollständigen Aufhebung der Glukose-induzierten Zunahme der h-sgk Genexpression führte. Diese Ergebnisse legen nahe, daß die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration durch vermehrten Einstrom über den L-Typ Calciumkanal, zur Zellvolumen-sensitiven Induktion der h-sgk Genexpression beitragen.

Ein weiterer möglicher Mechanismus der Signalübermittlung über erhöhte intrazelluläre Calciumspiegel besteht in der Entleerung von Calciumspeichern im Zellinneren. Diese Hypothese wird untermauert durch Funde von Tinel et al., 2000, bei denen eine Veränderung der extrazellulären Osmolarität zum vermehrten Calciumausstrom aus intrazellulären Speichern führte.

Letztendlich könnte die Erhöhung der Calciumkonzentration nicht nur direkt zur Zunahme der h-sgk m-RNA Transkriptkonzentration führen, sondern auch indirekt, indem das erhöhte intrazelluläre Calcium zur Aktivierung der Proteinkinase C führt, welche wiederum an der Induktion der h-sgk Genexpression maßgeblich beteiligt sein könnte (s. u.).

Proteinkinase C

Für eine ausgeprägte PKC-Sensitivität der Transkriptionsrate der h-sgk m-RNA sprechen die vollständige Unterbindung der Glukose-indzierten Zunahme der Genexpression der h-sgk durch die PKC-Inhibitoren Calphostin C und Staurosporin. Ebenso führte die Aktivierung der Proteinkinase C mittels Ionomycin und Phorboldidecanoat (PDD) zu einer deutlichen Zunahme der h-sgk m-RNA Transkriptkonzentration.

Desweiteren sprechen die zahlreichen AP-2-Elemente, die in der Promotorregion des humanen sgk-Gens enthalten sind, für eine Beteiligung PKC-sensitiver Transkriptionsmechanismen bei der Transkription der h-sgk m-RNA.

Über welche Mechanismen könnte nun die Proteinkinase C in die Regulation der h-sgk Genexpression eingreifen?

Die Proteinkinase C könnte direkt Calciumkanäle beeinflussen. Hierfür sprechen Funde von Cirillo et al., 1998 und Kamp et al., 2000, die nachweisen konnten, daß die PKC befähigt ist, Calciumkanäle vom L-Typ auf direktem Weg über Aktivierung der alpha-Untereinheit zu beeinflussen. Ebenso konnten sie beweisen, daß diese Aktivierung Nifedipin-sensitiv ist. Da in unseren Ergebnissen Nifedipin zur vollständigen Hemmung der Glukose-induzierten Genexpression der hsgk führte, können wir annehmen, daß der oben benannte Mechanismus an der Regulation der h-sgk m-RNA Transkription beteiligt ist.

Weitere Mechanismen könnten die Aktivierung der membranständigen Calciumpumpe (Calcium-Magnesium-ATPase) über die Proteinkinase C (Cirillo et al., 1995) oder die Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels durch Entleerung von Calciumspeichern im Zellinneren darstellen. Für letztere Hypothese spricht auch unsere Untersuchung über die Aktivierung der PKC über Ionomycin und die damit verbundene Induktion der h-sgk Genexpression. Denn Ionomycin führt über Erhöhung intrazellulären Calciums, unabhängig von Calciumaufnahme aus dem Extrazellularraum, zur Aktivierung der PKC.

Zuletzt wurde von Hayasaki et al., 1999 postuliert, daß die Proteinkinase C in Myozyten zur Aktivierung des Natrium-Kaliumaustauschers führte. Dessen Aktivierung wiederum führt zur Zellschwellung und damit, wie wir nachweisen konnten, zur Abnahme der h-sgk Genexpression. Der Natrium-Kaliumaustauscher könnte allerdings ein wichtiges Zielsubstrat der h-sgk darstellen. Im Rahmen der regulatorischen Zellvolumenzunahme (RVI) nach hypertoner Zellexposition und damit verbundener Zellschrumpfung könnte, die durch Zellschrumpfung-induzierte Zunahme der h-sgk Genexpression, zur Aktivierung des Natrium-Kaliumaustauschers führen und somit dazu beitragen, daß das verringerte Zellvolumen wieder auf das Ausgangsniveau zurückkehren kann. Hierbei könnte die h-sgk Genexpression sowohl über die Verringerung des Zellvolumens, als auch über die Proteinkinase C, die selbst über osmotische Veränderungen des Extrazellulärraums aktiviert werden kann, induziert werden.

P38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase

Ein weiterer Modulator der humanen Serin/Threoninkinase sgk könnte die durch Mitogene aktivierte Proteinkinase p38 darstellen. Die p38 Kinase ist ein Mitglied der MAPK Familie, zu denen unter anderem, die durch extrazelluläre Stimuli aktivierten Proteinkinasen ERK p42, p44 oder die durch Streß aktivierten Kinasen SAPK, JNK gehören. Eine Gemeinsamkeit dieser Kinasen ist die Aktivierung durch extrazelluläre Signale, wie hohe extrazelluläre Osmolarität, darauf folgende Translokation der Kinasen in den Zellkern, um dort die Expression spezifischer Gene zu stimulieren. Auch bei der Induktion der humanen Serin/Threoninkinase sgk durch hypertonen Streß in HepG2-Zellen konnte die Beteiligung der p38 Kinase nachgewiesen werden (Waldegger et al., 2000). Hierfür spricht die Inhibition der Hypertonizitäts-induzierten Expression der h-sgk durch den potenten p38 Kinase Inhibitor SB 202 190, als auch die Induktion der h-sgk Genexpression durch die p38 Kinase Aktivatoren Cycloheximid und Anisomycin. Diese beiden Proteinsynthese-Inhibitoren sind miteinander strukturell nicht verwandt und gelten als potente Stimuli der p38 Kinase.

Eine wichtige Frage in der über die p38 Kinase vermittelte Signaltransduktionskaskade ist die Beteiligung der Proteinkinase C. Hierzu finden sich unterschiedliche Ergebnisse. Während Schäffler et al., 2000 eine Beteiligung der PKC an der Glukose-induzierten Expression der p38 Kinase nachweisen konnten, durch Inhibition der PKC mittels Calphostin C, wiesen Zhang et al., 2000 nach, daß die Aktivierung der p38 Kinase PKC-unabhängig reguliert wird. Da die Blockade der PKC durch den spezifischen Inhibitor GF 109203X die Glukose-abhängige Phosphorylierung der p38 Kinase nicht verhinderte, folgerten sie, daß hohe Osmolarität alleine ein potenter Stimulus zur Aktivierung der p38 Kinase sein könnte.

Ein weiterer Anhaltspunkt für eine Beteiligung der p38 Kinase am Signaltransduktionsweg der Zellvolumen-sensitiven Proteinkinase h-sgk ist das Vorhandensein eines für den Myc-Max Transkriptionsfaktors charakteristische DNA-Sequenz innerhalb des h-sgk Promotorelements (Grandori et al., 1997), da die p38 Kinase nach Aktivierung zur Phosphorylierung folgender Transkriptionsfaktoren führt: Max, ATF, MEF2c und GADD153 (Zervus et al., 1995; Paul et al., 1997).

Jedoch konnten wir keinerlei Auswirkung der p38 Kinase auf das Transkriptionsverhalten der hsgk m-RNA nachweisen. So führte die spezifische Blockade der p38 Kinase mit dem Inhibitor SB 202 190 zu keiner Reduktion der Expressionsrate des h-sgk Gens. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu zahlreichen Funden über die Glukose-induzierte Regulation der p38-Kinase und die damit verbundene Aktivierung der Genexpression osmotisch-sensitiver Gene (Duzgen et al., 2000; Schäffler et al., 2000; Liu et al., 2000). Im Gegensatz zu der Induzierbarkeit der h-sgk Transkription durch die p38 Kinase in Hepatozyten der Zelllinie HepG2 (Waldegger et al., 2000) scheint die Regulation der h-sgk von der MAP-Kinase p38 unabhängig zu sein.

4.2. Promotorkonstrukt

Um Informationen über mögliche Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren, die an der Zellvolumen-sensitiven Transkription der h-sgk m-RNA beteiligt sein könnten, zu

erhalten, ist es äußerst wertvoll die 5' flankierenden DNA Bereiche des Genoms zu untersuchen. Die hierdurch erhaltenen Ergebnisse könnten wichtige Rückschlüsse über die an der Transkription beteiligten Signaltransduktionswege ermöglichen.

Erste Hinweise auf die Zellvolumen-sensitive Regulation der h-sgk Genexpression lieferten bereits Sequenzvergleiche des h-sgk Gens mit anderen klonierten Serin/Threoninkinasen (Waldegger et al., 1998). So fanden sich innerhalb der katalytischen Domänen große Sequenzhomologien zu Proteinkinasen der sogenannten „second messenger“-Familie. Zu diesen gehören unter anderem Proteinkinase C und die Calcium/Calmodulin regulierte Proteinkinassubfamilie (Stabel et al., 1991). Diese Funde legen bereits nahe, daß die humane Serin/Threoninkinase ebenfalls über Veränderungen des Zellvolumens reguliert werden könnte.

Um nähere Details über die möglichen Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren zu erfahren, die an der transkriptionellen Regulation der h-sgk Genexpression beteiligt sein könnten, untersuchten wir zwei Reportergenkonstrukte (Sac II und 1.1 Pro) innerhalb eines Bereichs von 2.4 kb der h-sgk Promotorregion. Zur Stimulation verwendeten wir Zellvolumenbeeinflussende Substanzen, wie Glukose, NaCl und TGF- β . Im Vergleich zu den Aktivitäten der jeweiligen Kontrollen zeigte sich keine signifikante Erhöhung der Promotoraktivität. Somit konnte erwiesen werden, daß keiner der vorhandenen Stimuli Einfluß auf die Promotoraktivität des Reportergenkonstrukts ausübte. Die Beteiligung der oben benannten Reportergenkonstrukte an der Zellvolumen-sensitiven Induktion der h-sgk Genexpression ist damit unwahrscheinlich.

4.3 Schlußfolgerung und klinischer Ausblick

Zusammenfassend läßt sich folgendes Modell der durch Glukose-regulierten Expression des h-sgk Gens in Endothelzellen erstellen:

Die Zellvolumen-sensitive humane Serin/Threoninkinase sgk wird bei der Regulation ihrer Genexpression sowohl über Veränderungen der extrazellulären Osmolarität (Glukose, Raffinose) und damit verbundener Veränderungen des Zellvolumens, als auch

über alleinige Veränderungen des Zellvolumens, bei konstanter extrazellulärer Osmolarität (Insulin, Glukagon), beeinflusst.

Bei der Signaltransduktionkaskade der h-sgk Genexpression spielen die Proteinkinase C und die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration eine maßgebliche Rolle.

Die Proteinkinase C könnte hierbei entweder direkt über Regulation von L-Typ Calciumkanälen zur Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration führen oder dazu beitragen, daß Calcium aus intrazellulären Speichern entleert wird. Ebenfalls könnte sie dazu beitragen, daß durch Aktivierung der membranständigen Calciumpumpe (Calcium-Magnesium-ATPase), die intrazelluläre Calciumkonzentration ansteigt.

Die Erhöhung des intrazellulären Calciums kann allerdings auch unabhängig von der Proteinkinase C reguliert werden. Hierbei könnten Veränderungen des Zellvolumens, bzw. Veränderungen der extrazellulären Osmolarität der adäquate Stimulus sein.

Eine mögliche Beteiligung der MAP-Kinasen bei der Signaltransduktion der h-sgk konnte in unserer Arbeit nicht geklärt werden. Eine Beteiligung der p38 Kinase an der Signaltransduktionkaskade der h-sgk wurde durch unsere Ergebnisse nicht bestätigt.

Bedeutsam für die Darstellung der möglichen Beteiligung der humanen Serin/Threoninkinase sgk an pathophysiologischen Prozessen, die mit Veränderungen des Zellvolumens assoziiert sind, ist die Suche nach potentiellen Substraten der h-sgk.

Hierbei stellt der erst kürzlich identifizierte epitheliale Natriumkanal ENaC ein mögliches Zielmolekül der h-sgk dar. ENaC spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Flüssigkeitsaufnahme in den Nieren, der Lunge und exokrinen Drüsen. Dysfunktion des ENaC ist verbunden mit einer Vielzahl an Erkrankungen, unter anderem Lungenödem und zystischer Fibrose (Rotin et al., 2000; Chraibi et al., 2001). Der epitheliale Natriumkanal ENaC wird von einer Vielzahl an Hormonen und Proteinen reguliert. Eines dieser regulierenden Proteine könnte die humane Serin/Threoninkinase sgk sein. Untermuert wird diese Vermutung durch Naraj-Fejes-Toth et al., 2000, die belegen konnten, daß die Serum-Glukokortikoid regulierte Kinase sgk, die bekanntlich eine hohe Sequenzhomologie zur humanen sgk aufweist, eine wichtige

regulatorische Funktion bei der Regulation des epithelialen Natriumkanals ENaC inne hat. Durch diese Funktion ist die sgk direkt am Ionentransport vom Extra- in den Intrazellularraum beteiligt und kann damit das Zellvolumen regulatorisch beeinflussen. Auch weitere Zellvolumenregulatorische Transportprozesse, wie der NaCl/KCl Kotransport oder der Natrium-Protonenaustauscher könnten direkt durch die humane Serin/Threoninkinase sgk gesteuert werden. Durch die Steuerung der benannten Transporter wäre die h-sgk unmittelbar an der Regulation des Zellvolumens beteiligt. Die Glukose-induzierte Zunahme der zellvolumen-sensitiven h-sgk Genexpression könnte ein wichtiges Bindeglied im Verständnis der pathophysiologischen Veränderungen im Rahmen des Diabetes mellitus darstellen. So führt z. B. die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, die auch zur Regulation der h-sgk beiträgt, unter anderem zur Verdickung der Basalmembran, welche wiederum eine bedeutende Rolle bei der Entstehung der diabetischen Glomerulosklerose Kimmelstiel-Wilson spielt (Williamson et al., 1998).

Schließlich wurde beschrieben, daß die humane Serin/Threoninkinase an einer Vielzahl von Fibrosierungsvorgängen und Entzündungsprozessen maßgeblich beteiligt ist (Klingel et al., 2000, Waldegger et al., 1999; Lang et al., 1999).

So konnte am Beispiel der diabetischen Nephropathie ein möglicher Zusammenhang zwischen Auswirkungen erhöhter extrazellulärer Glukosekonzentration auf die Regulation der h-sgk Genexpression und funktionellen Konsequenzen einer erhöhten h-sgk-Expression aufgeklärt werden (Lang et al., 1999). Die Aktivierung des NaCl/KCl Kotransporters könnte durch Abnahme des NaCl Transports zur Macula densa und damit verbundener Zunahme der glomerulären Filtration, zur Hyperfiltration führen. Hyperfiltration wiederum stellt einen der frühesten und schwerwiegendsten Faktoren dar, die zur renalen Dysfunktion im Rahmen der diabetischen Nephropathie beitragen. Außerdem wird von einer durch die h-sgk induzierten Stimulierung des epithelialen Natriumkanals ENaC angenommen (Lang et al., 1999), daß sie zur Induktion der Natriumretention führen und diese wiederum zur Entwicklung der Hypertonie führt. Zusammenfassend deuten die Beobachtungen darauf hin, daß eine veränderte

Diskussion der Ergebnisse

transkriptionelle Regulation der h-sgk an den pathophysiologischen Veränderungen bei der diabetischen Nephropathie und Hypertonie beteiligt sein könnte.

5. Diskussion der Methoden

5.1 Northern Blots

a) Probleme bezüglich des Agarosegels:

- im Gel befindliche Luftblasen verhindern sowohl die Polymerisation, als auch den elektrophoretischen Transport der RNA
- Konzentration der Agarose zu gering/zu hoch bewirkt, daß die mRNA im Gel zu schnell/langsam transportiert wird, d.h. Widerstand bei der Elektrophorese ist zu gering/zu hoch
- in der Gelkammer bzw. im Gel sich befindende RNAsen führen zur Degradierung der mRNA
- Gel ungleichmäßig in die Gelkammer gegossen, bewirkt, daß es zum ungleichmäßigen Transport der mRNA während der Elektrophorese kommt, was letztendlich dazu führt, daß die Ergebnisse der Elektrophorese nicht mehr verwertbar sind
- ungleichmäßiges Beladen der Geltaschen mindert die Aussagekraft der Elektrophorese

b) Probleme bezüglich der RNA Proben:

- wenn nach der Elektrophorese keine RNA im Gel detektiert werden kann, liegt dies begründet in:
 1. die Menge der aufgetragenen RNA war zu gering
 2. Kontamination der RNA mit denaturiertem Protein bewirkt, daß die RNA die Oberfläche des Gels nicht durchdringen kann, obwohl RNA mit geringem Molekulargewicht in das Gel eindringen sollte

3. die RNA wurde zu winzigen Fragmenten degradiert, die das Gel passieren können
 4. beim Beladen des Agarosegels ist die Probe nicht in die Geltaschen gesunken, da z.B. der Alkoholgehalt in der Probe noch zu groß war
 5. die Konzentration der Agarose im Gel kann zu hoch gewählt worden sein
- die RNA Banden sind zu breit, bzw. verschmiert, Ursache hierfür kann sein
 1. Zusammensetzung der Elektrophoresepuffer ist inkorrekt
 2. Salzkonzentration des Ladepuffers ist zu hoch
 3. falscher ph-Wert der Puffer
 4. zu großes Volumen der RNA Probe
 5. zu hohe Konzentration an RNA
 6. Proteinextraktionsmethode ist ungeeignet
 - Hintergrundschwärzung auf dem Röntgenfilm wird entweder durch Verunreinigungen des Gels, die ihrerseits UV-Licht absorbieren können, verursacht oder durch Schmutz und Staub, welche die Gelreagenzien kontaminieren. Des weiteren können auch Luftblasen zu einem ungleichmäßigen Hintergrund führen.
 - Aggregation der RNA. RNA, die von bestimmten Organismen gewonnen wird, hat eine große Tendenz zu aggregieren, was zu Problemen führt, wenn die RNA auf nicht-denaturierenden Gelen aufgetragen wird.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß der Northern Blot eine gute quantitative Auswertung der spezifischen mRNA zuläßt. Jedoch kann man von einer Änderung der mRNA Konzentration eines Gens nicht automatisch auf eine vermehrte Transkription des entsprechenden Genabschnitts schließen, da es ebenso sein kann, daß die stimulierte Substanz lediglich zu einer Verlängerung der Halbwertszeit der entsprechenden Transkripte geführt hat.

5.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Vorteile der Polymerasekettenreaktion liegen unter anderem in ihrer extrem hohen Sensitivität bezüglich des Nachweises von kleinsten Mengen an DNA.

Bei Verwendung externer oder interner Standards kann sie auch zu Aussagen bezüglich der Menge der Ausgangssubstanz herangezogen werden. Hierbei können jedoch lediglich semiquantitative Aussagen getroffen werden.

5.3 Reporteranalyse mittels des Dual Luziferase-Essay-Systems

Der Vorteil dieses Untersuchungsverfahrens liegt darin, daß zwei unterschiedliche Reporter in ein und demselben System verwendet werden können, wobei beide Reporter in einer einzigen Probe verarbeitet werden können, da die Inkubationszeiten der beiden Reporter gleich lang sind. Hierbei enthält ein Vektor das experimentelle Reporterogen, durch Kotransfektion eines zweiten Luciferasegens, kann ein interner Standard geliefert werden, gegen den die Messung des anderen Reporter gens abgeglichen wird.

Relative Unterschiede in der Expression der Reporteraktivitäten korrelieren jeweils mit Veränderungen der transkriptionellen Aktivität des zu bestimmenden Reporters.

Dies ermöglicht, unter Bildung eines Quotienten aus den beiden Aktivitäten, einen Wert zu ermitteln, der schließlich unabhängig von der jeweiligen Transfektionseffizienz ist.

6. Zusammenfassung

Die im Rahmen eines Diabetes mellitus auftretenden Schwankungen der Blutglukosekonzentration sind wesentlicher Auslöser jener pathogenetischer Mechanismen, die zu einer endothelialen Dysfunktion führen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen Glukose-induzierten Tonizitätsänderungen und endothelialer Zellfunktion untersucht. Zu diesem Zweck wurde die transkriptionelle Regulation der sgk-Serin/Threonin-Proteinkinase in der humanen Endothelzelllinie h-MEC als Bindeglied zwischen Zellvolumen und Mechanismen der zellulären Signaltransduktion bestimmt.

Die Erhöhung der extrazellulären Glukosekonzentration führte schon ab 20 mM Glukose innerhalb von 60 Minuten zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der Transkription von sgk-mRNA. Dieser Effekt konnte durch das nicht membranpermeable Agens Raffinose vollständig nachgeahmt werden, was eine Beteiligung metabolischer Mechanismen an der transkriptionellen Regulation der sgk unwahrscheinlich macht.

Insulin, welches zu einer Zellschwellung durch Aktivierung des Na^+/H^+ -Austauschers und des $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ Kotransporters führt, bewirkte eine Verminderung der Transkriptionsrate der sgk-mRNA.

Glukagon hingegen, das durch Aktivierung von Kalium-, und Chloridkanälen Zellen schrumpfen läßt, zeigte keinerlei Auswirkung auf die Transkription der sgk-mRNA.

Die durch Glukose-Exposition induzierte Hochregulation der sgk-Transkriptionsrate wurde nach Blockade der Proteinkinase C durch Calphostin und Staurosporin, sowie durch den Calciumkanalblocker Nifedipin vermindert.

Aktivatoren der Proteinkinase C, wie PMA oder ein durch Ionomycin induzierter Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, führten zu einer starken Zunahme der Transkription der *sgk* in h-MEC Zellen. Dies läßt folgern, daß ein PKC abhängiger Signaltransduktionsweg an der tonizitätsmodulierten Wirkung der *sgk* Regulation beteiligt ist.

Die Analyse der Promoterregion des humanen *sgk*-Gens zeigte zusätzlich zu typischen Promotorelementen, wie die TATA-Box und verschiedene GC-Elemente, elf AP-2 Elemente, die die PKC-abhängige transkriptionelle Hochregulation der *sgk* vermitteln könnten.

Ebenso spielte die intrazelluläre Calciumkonzentration eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression der *sgk*. Eine Hemmung der L-Typ Calciumkanäle durch Nifedipin, führte zu einer Reduktion der Transkriptionsrate der *sgk*-mRNA. Desweiteren führte der durch Ionomycin induzierte Anstieg des intrazellulären Calciums zu einer Zunahme der Expression des *sgk*-Gens.

Signaltransduktionskaskaden durch die Mitogen aktivierte Proteinkinase p-38 konnten ausgeschlossen werden, da eine Hemmung dieser Kinase durch den spezifischen Inhibitor SB 202 190 zu keiner Inhibition der Transkription von *sgk*-mRNA führte.

Die tonizitätsinduzierte Signaltransduktion der *sgk*-Transkription wird somit sowohl über eine Zunahme der zytosolischen freien Calciumkonzentration, als auch über eine Aktivierung der Proteinkinase C vermittelt.

7. Literaturverzeichnis:

1. Avruch, J., Khokhlatchev, A., Kyriakis, J. M., Luo, Z., Tzivion, G., Vavvas, D., Zhang, X. F. (2001)
Ras activation of the raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade.
Recent Prog Horm Res, 56127-56155
2. Barbagallo, M., Shan, J., Pang, P. K., Resnick, L. M. (1995)
Glucose-induced alterations of cytosolic free calcium in cultured rat tail artery vascular smooth muscle cells.
J. Clin. Invest. 95, 763-767
3. Barletta, C., Pelicci, P. G., Kenyon, L. C., Smith, S. D., Dalla-Favera, R. (1987)
Relationship between the c.myb locus and the 6q-chromosomal aberration in leukemias and lymphomas.
Science 235, 1064-1067
4. Baynes, J. W., Thorpe, S. R. (1999)
Role of oxidative stress in diabetic complications.
Diabetes 48, 1-9
5. Bierhaus, A., Hofmann, M. A., Ziegler, R., Nawroth, P. P. (1998)
AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. 1. The AGE concept.
Cardiovascular Research 37, 586-600.
6. Bonny, O., Chraïbi, A., Loffing, J., Jaeger, N. F., Grunder, S., Horisberger, J. D., Rossier, B. C. (1999)
Functional expression of a pseudohypoaldosteronism type 1 mutated epithelial Na⁺ channel lacking the pore-forming region of its alpha subunit.
J Clin Invest 104, 967-974
7. Brownlee, M. (1994)
Glycation and diabetic complications.
Diabetes 43, 836-841.
8. Burg, M. B., Garcia-Perez, A. (1992)
How tonicity regulates gene expression.
J. Am. Soc. Nephrol. 3, 121-127
9. Buse, P., Tran, S. H., Luther, E., Phu, P. T. P., Aponte, G. W., Firestone, G. L. (1999)
Cell cycle and hormonal control of nuclear-cytoplasmic localization of the serum-

- and glucocorticoid-inducible protein kinase, sgk, in mammary tumor cells.
J Biol Chem. 274, 7253-7263
10. Cagliero, E., Roth, T., Roy, S., Lorenzi, M. (1991)
Characteristics and mechanisms of high-glucose-induced overexpression of basement membrane components in cultured human endothelial cells.
Diabetes 40, 102-110
 11. Casillas, A. M., Amaral, K., Chegini-Farahani, S., Nel, A. E. (1993)
Okaidic acid activates p-42 mitogen-activated protein kinase (MAP kinase; ERK-2) in B-lymphocytes but inhibits rather than augments cellular proliferation: contrast with phorbol 12-myristate 13-acetate.
Biochem. J. 290, 545-550
 12. Cavallini, L., Alexandre, A. (1993)
Ca²⁺ efflux from platelets. Control by protein kinase C and the filling state of the intracellular Ca²⁺ stores.
Eur J Biochem 222, 693-702
 13. Charonis, A. S., Reger, L. A., Dege, J. E. (1990)
Laminin alterations after in vitro nonenzymatic glycosylation.
Diabetes 39, 807-814
 14. Chen, S.-Y., Bhargava, A., Astroberardino, I. M., Meijer, O. C., Ang, J. W., Buse, P., Firestone, G. L., Verrey, F., Pearce, D. (1999)
Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk.
Proc Natl Acad Sci USA 96, 2514-2519
 15. Cirillo, M., Canessa, M., Quinn, S., Conlin, P. R. (1998)
Protein Kinase C activation stimulates calcium transport in adrenal zona glomerulosa cells.
Biochem Biophys Res Comm 245, 466-471
 16. Cohen, M. P., Klepser, H. (1988)
Glomerular Na⁺/K⁺-ATPase activity in acute and chronic diabetes and with aldose reductase inhibition.
Diabetes 37, 558-562
 17. Cohen, P., Alessi, D. R., Cross, D. A. (1997)
PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction?
FEBS-Lett. 410, 3-10

18. Crawley, J. B., Rawlinson, L., Lali, F. V., Page, T. H., Saklatvala, J., Foxwell, B. M. (1997)
T cell proliferation in response to interleukins 2 und 7 requires p38 MAP kinase activation.
J. Biol. Chem. 272, 15023-15027
19. Demaurex, N., Grinstein, S. (1994)
Na⁺/H⁺ antiport: modulation by ATP and role in cell volume regulation.
J. Exp. Biol. 196, 389-404
20. Demerdash, T. M., Seyrek, N., Smogorzewski, M., Marcinkowski, W., Nasser-Moadelli, S., Massry, S. G. (1996)
Pathways through which glucose induces a rise in [Ca²⁺]_i of polymorphonuclear leukocytes of rats.
Kidney International 50, 2032-2040
21. De Meyer, G.R.Y., Herman, A.G. (1997)
Vascular endothelial dysfunction
Progress in Cardiovascular Diseases 34, 325-342
22. Derubertis, F.R., Craven, P.A. (1994)
Activation of Protein Kinase C in glomerular cells in diabetes.
Diabetes 43, 1-8.
23. Drake, P. G., Balbis, A., Wu, J., Bergeron, J. J., Posner, B. I. (2000)
Association of phosphatidylinositol 3-kinase with the insulin receptor: compartmentation in rat liver.
Am J Physiol Endocrinol Metab 279, E266-E274
24. Draznin, B., Leitner, J. W., Sussman, K. E., Sherman, N. A. (1988)
Insulin and glucose modulate protein kinase C activity in rat adipocytes.
Biochemical and Biophysical Research Communications 156, 570-575
25. Duzgen, S. A., Rasque, H., Kito, H., Azuma, N., Li, W., Barson, M. D., Gahtan, U., Dudrick, S. J., Sumpio, B. E. (2000)
Mitogen-activated protein phosphorylation in endothelial cells exposed to hyperosmolar conditions.
J. Cell. Biochem, 76, 567-571
26. Elliott, T. G., Cockcroft, J. R., Groop, P. H., Viberti, G. C., Ritter, J. M. (1993)
Inhibition of nitric oxide synthesis in forearm vasculature of insulin-dependent

- diabetic patients: blunted vasoconstriction in patients with microalbuminuria.
Clin Sci 83, 687-693
27. Erneux, C., Govaerts, C., Communi, D., Pesesse, X. (1998)
The diversity and possible functions of the inositol polyphosphate 5-phosphatases.
Biochim. Biophys. Acta 1436, 185-199
28. Esposito, C., Gerlach, H., Brett, J., Stern, D., Vlassara, H. (1992)
Endothelial receptor-mediated binding of glucose modified albumin is associated
with increased monolayer permeability and modulation of cell surface coagulant
properties.
J Exp Med 170, 1387-1407
29. Ford, I., Singh, T. P., Kitchen, S., Makris, M., Ward, J.D., Preston, F.E. (1991)
Activation of coagulation in diabetes mellitus in relation to the presence of vascular
complications.
Diabet Med. 8, 322-329
30. Geck, P., Pfeiffer, B. (1985)
 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransport in animal cells: its role in volume regulation.
Ann NY Acad Sci 456, 166-182
31. Giugliano, D., Ceriello, A., Paolisso, G. (1996)
Oxidative stress and diabetic vascular complications.
Diabetes Care 19, 257-267
32. Goddard, H., Manison, N. F., Tomos, D., Brownlee, C. (2000)
Elemental propagation of calcium signals in response-specific patterns determined
by environmental stimulus strength.
Proc Natl Acad Sci USA 97, 1932-1937
33. Graf, J., Haussinger, D. (1996)
Ion transport in hepatocytes: mechanisms and correlations to cell volume,
hormone actions and metabolism.
J Hepatol 24, 53-77
34. Grandori, C., Eisenman, R. N. (1997)
Myc target genes.
TIBS 22, 177-181
35. Gaussin, V., Baquet, A., Hue, L. (1992)
Cell shrinkage follows, rather than mediates, the short-term effects of glucagon on

- carbohydrate metabolism.
Biochem J. 287, 17-20
36. Greene, D. A., Lattimer, S. A., Sima, A. A. F. (1987)
Sorbitol, phosphoinositides, and sodium-potassium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complications.
N Engl J Med 316, 599-606
37. Greene, D. A., Lattimer, S. A., Sima, A. A. F. (1988)
Are disturbances of sorbitol, phosphoinositide, and Na⁺-K⁺-ATPase regulation involved in pathogenesis of diabetic nephropathy?
Diabetes 37, 688-693
38. Grinstein, S., Woodside, M., Sardet, C., Pouyssegur, J., Rotin, D. (1992)
Activation of the Na⁺/H⁺ antiporter during cell volume regulation. Evidence for a phosphorylation-independent mechanism.
J. Biol. Chem. 267, 23823-23828
39. Gypakis, A., Wasner, H. K. (2000)
Phosphatidylinositol 3-kinase and prostaglandylinositol cyclic phosphate, a mediator of insulin action, in the signal transduction of insulin.
Biol Chem, 381, 1139-1141
40. Hallbrucker, C., Vom Dahl, S., Lang, F., Gerok, W., Häussinger, D. (1991)
Modification of liver cell volume by insulin and glucagon.
Pflügers Arch. 418, 519-521
41. Hamsten, A. (1995)
Hemostatic function and coronary artery disease.
N Engl J Med. 332, 677-678
42. Hashimoto, S., Matsumoto, K., Gon, Y., Nakayama, T., Takeshita, I., Horie, T. (1999)
Hyperosmolarity-induced interleukin-8 expression in human bronchial epithelial cells through p38 mitogen-activated protein kinase.
A J Respir Crit Care Med. 159, 634-640
43. Haussinger, D. (1993)
Control of protein turnover by the cellular hydration state.
Ital J Gastroenterol 25, 42-48
44. Haussinger, D., Roth, E., Lang, F., Gerok, W. (1993)
Cellular hydration state: an important determinant of protein catabolism

- in health and disease.
Lancet 341, 1330-1332
45. Haussinger, D., Lang, F., Gerok, W. (1994)
Regulation of cell function by the cellular hydration state.
Am. J. Physiol. 267, E 343-355
46. Haussinger, D., Schliess, F., Dombrowski, F., Vom Dahl, S. (1999)
Involvement of p38 MAPK in the regulation of proteolysis by liver cell hydration.
Gastroenterology 116, 921-935
47. Hawthorne, G. C., Barlett, K., Hetherington, C. S. (1989)
The effect of high glucose on polyol pathway activity and myoinositol mechanism
in cultured human endothelial cells.
Diabetologia 32, 163-166
48. Hayasaki-Kajiwara, Y., Kitano, Y., Iwasaki, T., Shimamura, T., Naya, N., Iwaki,
K., Nakajima, M. (1999)
Natrium influx via Na^+/H^+ exchange activates protein kinase C isoenzymes delta
and epsilon in cultured neonatal rat cardiac myocytes.
J Mol Cell Cardiol 31, 1559-15572
49. Hoffman, J. M., Ishizuka, T., Farese, R. V. (1991)
Interrelated effects of insulin and glucose on diacylglycerol-protein kinase C
signalling in rat adipocytes and solei muscle in vitro and in vivo in diabetic rats.
Endocrinology 128, 2937-2948
50. Hofmann, J. (1997)
The potential for isoenzyme-selective modulation of protein kinase C.
FASEB Journal 11, 649-669
51. Hogan, M., Cerami, A., Bucala, R. (1992)
Advanced glycosylation end products block the antiproliferative effect of nitric
oxide: role in the vascular and renal complications of diabetes mellitus.
J Clin Invest 90, 1110-1115
52. Hohman, T. C., Beg, M. A. (1994)
Diabetic complications: progress in the development of treatments.
Exp Opin Invest Drugs 3, 1041-1049
53. Huszka, M., Kaplar, M., Rejto, L., Tornai, I., Palatka, K., Lszlo, P., Udvardy, M.
(1997)
The association of reduced endothelium derived relaxing factor-NO

- production with endothelial damage and increased in vivo platelet activation in patients with diabetes mellitus.
Thrombosis Res 86, 173-180
54. Ido, Y., Kilo, C., Williamson, J. R. (1996)
Interactions between the sorbitol pathway, non-enzymatic glycation, and diabetic vascular dysfunction.
Nephrol Dial Transplant. 11, 72-75
55. Junger, W. G., Hoyt, D. B., Hamreus, M., Liu, F. C., Herdon-Remelius, C., Junger, W., Altman, A. (1997)
Hypertonic saline activates protein tyrosine kinases and mitogen-activated protein kinase p38 in T-cells.
J Trauma. 42, 437-443
56. Kamp, T. J., Hell, J. W. (2000)
Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C.
Cir Res 87, 1095-1102
57. Kanashiro, C. A., Khalil, R. A. (1998)
Signal transduction by protein kinase C in mammalian cells.
Clin Exp Physiol Pharmacol 25, 974-985
58. Kapus, A., Grinstein, S., Wasan, S., Kandasamy, R., Orłowski, J. (1994)
Functional characterization of three isoforms of the Na⁺/H⁺ exchanger stably expressed in Chinese hamster ovary cells. ATP dependence, osmotic sensitivity, and role in cell proliferation.
J. Biol. Chem. 269, 23544-52
59. Kashiwagi, A., Asahina, T., Ikebuchi, M., Tanaka, Y., Takagi, Y., Nishio, Y., Kikkawa, R., Shigeta, Y. (1994)
Abnormal glutathione metabolism and increased cytotoxicity caused by H₂O₂ in human umbilical vein endothelial cells cultured in high glucose medium.
Diabetologia 37, 264-269
60. Kashiwagi, A., Asahina, T., Nishio, Y., Ikebuchi, M., Tanaka, Y., Kikkawa, R., Shigeta, Y. (1996)
Glycation, oxidative stress, and scavenger activity: glucose metabolism and radical scavenger dysfunction in endothelial cells.
Diabetes 45, S84-86

61. Kayali, A. G., Austin, D. A., Webster, N. J. (2000)
Stimulation of MAPK cascades by insulin and osmotic shock: lack of an involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in glucose transport in 3T3-L1 adipocytes.
Diabetes 49, 1783-1793
62. King, G. L., Shiba, T., Oliver, J., Inoguchi, T., Bursell, S.-E. (1994)
Cellular and molecular abnormalities in the vascular endothelium of diabetes mellitus
Annu. Rev. Med. 45, 179-88
63. Kirstein, M., Aston, C., Hintz, R., Vlassara, H. (1992)
Receptor-specific induction of insulin-like growth factor I in human monocytes by advanced glycosylation end product-modified proteins.
J Clin Invest 90, 439-446
64. Kobayashi, T., Cohen, P. (1999)
Activation of serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate phosphatidylinositol 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) and PDK2.
Biochem J. 339, 319-328
65. Komers, R., Allen, T. J., Cooper, M.E (1994)
Role of endothelium-derived nitric oxide in the pathogenesis of the renal hemodynamic changes of experimental diabetes.
Diabetes 43, 1190-1197
66. Klein, D. J. K., Oegama, T. R., Brown, D. M. (1989)
Release of glomerular heparan-sulfate proteoglycan by heparin from glomeruli of streptozocin-induced diabetic rats.
Diabetes 38, 130-139
67. Klingel, K., Warntges, S., Bock, J., Wagner, C. A., Sauter, M., Waldegger, S., Kandolf, R., Lang, F. (2000)
Expression of cell volume-regulated kinase h-sgk in pancreatic tissue.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 279, G998-G1002
68. Kowluru, R. A., Jirousek, M. R., Stramm, L., Farid, N., Engerman, R. L., Kern, T. S. (1998)
Abnormalities of retinal metabolism in diabetes or experimental galactosemia: V. Relationship between protein kinase C and ATPases.
Diabetes 47, 464-469

69. Krumpf, E., Nikitas, K., Grinstein, S. (1997)
Induction of tyrosine phosphorylation and Na⁺/H⁺ exchanger activation during shrinkage of human neutrophils.
J Biol Chem 272, 17303-17311
70. Lambert, J., Aarsen, M., Donker, A. J. M., Stehouwer, C. D. A. (1996)
Endothelium-dependent and-independent vasodilation of large arteries in normoalbuminuric insulin-dependent diabetes mellitus
Arterioscl Thromb Vasc Biol 16, 705-711
71. Lang, F., Paulmichl, M. (1995)
Properties and regulation of ion channels in MDCK cells.
Kidney Int 48, 1200-1205
72. Lang, F., Busch, G. L., Ritter, M., Völkl, H., Waldegger, S., Gulbins, E., Häussinger, D. (1998)
Functional significance of cell volume regulatory mechanisms.
Physiological Reviews 78, 247-306
73. Lang, F., Klingel, K., Wagner, C. A., Stegen, C., Warntges, S., Friedrich, B., Lanzendörfer, M., Melzig, J., Moschen, I., Steuer, S., Waldegger, S., Sauter, M., Paulmichl, M., Gerke, V., Risler, T., Gamba, G., Capasso, G., Kandolf, R., Hebert, S. C., Massry, S. G., Broer, S. (2000)
Deranged transcriptional regulation of cell-volume-sensitive kinase hSGK in diabetic nephropathy.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 8157-8162
74. Lanzendörfer, M., Waldegger, S., Steuer, S., Nagl, U. O., Barth, P., Lang, F. (1998)
Induction of the sgk serine-threonine protein kinase by glucose in human endothelial cells.
Pflügers Arch Eur J Physiol 435, 86
75. Larkins, R. G., Dunlop, M. E. (1992)
The link between hyperglycaemia and diabetic nephropathy.
Diabetologia 35, 499-504
76. Lee, T.-S., Saltsman, K. A., Ohashi, H., King, G. L. (1989)
Activation of protein kinase C by elevation of glucose concentration: proposal for a mechanism in the development of diabetic vascular complications.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 5141-5145

77. Lee, J. C., Laydon, J. T., McDonnell, P. C., Gallagher, T. F., Kumar, S., Green, D. McNulty, D., Blumenthal, M. J. Heys, J. R., Landvatter, S. W., Strickler, J. E., McLaughlin, M. M., Siemens, I. R., Fisher, S. M., Livi, G. P., White, J. R., Adams, J. L., Youg, P. R. (1994)
A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis.
Nature 372, 739-746
78. Levy, J., Rempinski, D. (1989)
A hormone specific defect in insulin regulation of the membrane ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$)-ATPase in obesity.
Clin Res 37, 455
79. Levy, J., Grunberger, G., Karl, I., Gavin, J. R. (1990)
Effects of food restriction and insulin treatment on ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$)-ATPase response to insulin in kidney basolateral membranes of non-insulin-dependent diabetic rats.
Metabolism 39, 25-33
80. Levy, J., Gavin, J. R., Sowers, J. R. (1994)
Diabetes mellitus: A disease of abnormal cellular calcium metabolism?
The American Journal of Medicine 96, 260-273
81. Liu, W., Schoenkerman, A., Lowe, W. L., (2000)
Activation of members of the mitogen-activated protein kinase family by glucose in endothelial cells.
Am J Physiol Endocrinol Metab, 279, E 782-790
82. Löffler, G., Petrides, P. E. (1997)
Biochemie und Pathobiochemie.
Springer, Berlin, Heidelberg, New York
83. Lyons, T. J., Jenkins, A. J. (1997)
Glycation, oxidation, and lipoxidation in the development of the complications of diabetes: a carbonyl stress hypothesis.
Diabetes Rev 5, 365-391
84. Magnan, C., Philippe, J., Kassis, N., Laury, M. C., Penicaud, L., Gilbert, M., Ktorza, A. (1995)
In vivo effects of glucose and insulin on secretion and gene expression of glucagon in rats.
Endocrinology 136, 5370-5376

85. Marandi, S., De Kayser, N., Saliez, A., Maernoudt, A. S., Sokal, E. M., Stilmant, C., Rider, M. H., Buts, J. P. (2001)
Insulin signal transduction in rat small intestine: role of MAP kinases in expression of mucosal hydrolases.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 280, G229-G240
86. Marunaka, Y., Niisato, N., O'Brodivich, H., Post, M., Tanswell, A. K. (1999)
Roles of Ca^{2+} and protein tyrosine kinase in insulin action on cell volume via Na^+ and K^+ channels and $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter in fetal rat alveolar type II pneumocyte.
J Membr Biol 168, 91-101
87. Maser, R. E., Wolfson, S. K., Ellis, D. (1991)
Cardiovascular disease and arterial calcification in insulin-dependent diabetes mellitus: interrelations and risk factor profiles.
Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study-V.
Arterioscler Thromb 11, 958-965
88. Mazzanti, L., Rabini, R. A., Faloia, E., Fumelli, P., Bertoli, E., De Pirro, R. (1990)
Altered cellular Ca^{2+} and Na^+ transport in Diabetes mellitus.
Diabetes 39, 850-854
89. McCord, J. M. (1985)
Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury.
N Engl J Med 312, 159-163
90. Mene, P., Pugliese, G., Pricci, F., Di Mario, U., Cinotti, G. A., Pugliese, F. (1997)
High glucose level inhibits capacitative Ca^{2+} influx in cultured rat mesangial cells by a protein kinase C-dependent mechanism.
Diabetologia 40, 521-527
91. Mitelman, F., Mertans, F., Johansson, B. (1997)
A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia.
Nat. Genet. 15, 417-474
92. Mochly-Rosen, D., Gordon, A. S. (1998)
Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isoenzyme selectivity.
FASEB Journal 12, 35-42
93. Moriguchi, T., Toyoshima, F., Gotoh, Y., Iwamatsu, A., Irie, K., Mori, E., Kuroyanagi, N., Hagiwara, M., Matsumoto, K., Nishida, E. (1996)

- Purification and identification of a major activator for p38 from osmotically shocked cells. Activation of mitogen-activated protein kinase 6 by osmotic shock, tumor necrosis factor-alpha and H₂O₂.
J Biol Chem 271, 26981-26988
94. Mullarkey, C., Edelstein, D., Brownlee, M. (1990)
Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes.
Biochem Biophys Res Commun 173, 932-939
95. Naray-Fejes-Toth, A., Fejes-Toth, G. (2000)
The sgk, an aldosterone-induced gene in mineralocorticoid target cells, regulates the epithelial sodium channel.
Kidney Int 57, 1290-1294
96. Naray-Fejes-Toth, A., Canessa, C., Cleaveland, E. S., Aldrich, G., Fejes-Toth, G. (1999)
Sgk is an aldosterone-induced kinase in the renal collecting duct.
J Biol Chem. 274, 16973-16978
97. Nishizuka, Y. (1992)
Intracellular signalling by hydrolysis of phospholipids and activation of Protein Kinase C.
Science 258, 607-614
98. Ohara, T., Sussman, K. E., Draznin, B. (1991)
Effect of diabetes on cytosolic free Ca²⁺ and Na⁺-K⁺-ATPase in rat aorta.
Diabetes 40, 1560-1563
99. Park, J., Leong, M. L. L., Buse, P., Maiyar, A. C., Firestone, G. L., Hemmings, B. A. (1999)
Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signalling pathway.
EMBO 18, 3024-3033
100. Park, J. Y., Takahara, N., Gabriele, A., Chou, E., Naruse, K., Suzuma, K., Yamauchi, T., Ha, S. W., Meier, M., Rhodes, C. J., King, G. L. (2000)
Induction of endothelin-1 expression by glucose: an effect of protein kinase C activation.
Diabetes 49, 1239-1248

101. Pober, J. S., Cotran, R. S. (1990)
Cytokines and endothelial cell biology.
Physiol Rev. 70, 427-451
102. Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J. S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R. J.,
Davis, R. J. (1995)
Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated
protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine.
J. Biol. Chem. 270, 7420-7426
103. Rotin, D. (2000)
Regulation of the epithelial sodium channel (ENaC) by accessory proteins.
Curr Opin Nephrol Hypertens 9, 529-534
104. Roy, S., Sala, R., Cagliero, E., Lorenzo, M. (1990)
Overexpression of fibronectin induced by diabetes or high glucose: phenomenon
with a memory.
Proc Natl Acad Sci USA 87, 404-408
105. Ruoslahti, E., Yamaguchi, Y. (1991)
Proteoglycans as modulators of growth factor activities.
Cell 64, 867-869
106. Sahai, A., Xu, G., Sandler, R. S., Tannen, R. L. (1992)
Hypoxia-mediated impaired differentiation by LLC-PK₁ cells:
Evidence based on the protein kinase C profile.
Kidney International 42, 1145-1152
107. Schaefer, W., Prießen, J., Mannhold, R., Gries, A. F. (1987)
Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase activity of human red blood cells in healthy and diabetic
volunteers.
Klin Wochenschr 65, 17-21
108. Schäffler, A., Arndt, H., Schölmerich, J., Palitzsch, K.-D. (2000)
Amelioration of hyperglycemic and hyperosmotic induced vascular dysfunction by
in vivo inhibition of protein kinase C and p38 MAP kinase pathway in the rat
mesenteric microcirculation.
Eur. J. Clin. Invest. 30, 586-593
109. Schmidt, A. M., Hori, O., Brett, J., Yan, S. D., Wautier, J.-L., Stern, D. (1994)
Cellular receptors for advanced glycation end products.
Arterioscler Thromb. 14, 1521-1528.

110. Schmidt, A. M. Yan, S. D., Stern, D. M. (1995)
The dark side of glucose.
Nature Med 1, 1002-1004
111. Schmidt, A. M., Crandall, J., Hori, O., Cao, R., Lakatta, E. (1996)
Elevated plasma levels of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in diabetic patients with microalbuminuria: a marker of vascular dysfunction and progressive vascular disease.
Br J Haematol. 92, 747-750
112. Schwenger, P., Bellosta, P., Vietor, I., Basilico, C., Skolnik, E. Y., Vilcek, J. (1997)
Sodium salicylate induces apoptosis via p38 mitogen activated protein kinase but inhibits tumor necrosis factor-induced c-Jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase activation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 2869-2873
113. Sheikh-Hamad, D., Di Mari, J., Suki, W. N., Safirstein, R., Watts, B. A., Rouse, D. (1998)
P38 kinase activity is essential for osmotic induction of mRNAs for HSP70 and transporter for organic solute betaine in Madin-Darby canine kidney cells.
114. Smith, W. L. (1986)
Prostaglandin biosynthesis and its compartmentation in vascular smooth muscle and endothelial cells.
Annu Rev Physiol 48, 251-262
115. Smogorzewski, M., Galfayan, V., Massry, S. G. (1998)
High glucose concentration causes a rise in $[Ca^{2+}]_i$ of cardiac myocytes.
Kidney Int 53, 1237-1243
116. Sowers, J.R., Epstein, M. (1995)
Diabetes mellitus and associated hypertension, vascular disease and nephropathy.
Hypertension. 26, 869-879.
117. Stehouwer, C. D. A., Nauta, J. J. P., Zeldenrust, G. C., Hackeng, W. H. L., Donker, A. J. M., den Ottolander, G. J. H. (1992)
Albuminuria, cardiovascular disease, and endothelial dysfunction in non-insulin-dependent diabetes mellitus.
Lancet 340, 319-323
118. Stehouwer, C. D. A., Fischer, H. R. A., van Kuijk, A. W. R., Polak, B. C. P., Donker, A. J. M. (1995)

- Endothelial dysfunction precedes development of microalbuminuria in insulin-dependent diabetes mellitus.
Diabetes 44, 561-564
119. Stehouwer, C.D.A., Lambert, J., Donker, A.J.M., van Hinsbergh, V.W.M. (1997)
Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy
Cardiovascular Research 34, 55-68
120. Studer, R. K., Ganas, L. (1989)
Effect of diabetes on hormone-stimulated and basal hepatocyte calcium metabolism.
Endocrinology 125, 2421-2433
121. Tomlinson, D. R., Stevens, E. J., Diemel, L. T. (1994)
Aldose reductase inhibitors and their potential for the treatment of diabetic complications.
TIPS 15, 293-297
122. Vane, J.R., Anggard, E..E., Botting, R.M. (1990)
Mechanisms of disease: regulatory functions of the vascular endothelium.
N Engl J Med 332, 27-36
123. Vlassara, H., Bucala, R., Striker, L. (1994)
Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biological and clinical implications for diabetes and aging.
Lab Invest 70, 138-151
124. Vlassara, H. (1995)
Advanced glycation in diabetic renal and vascular disease.
Kidney Int 48, 43-44
125. Vom Dahl, S., Hallbrucker, C., Lang, F., Gerok, W., Häussinger, D. (1991)
Regulation of liver cell volume and proteolysis by glucagon and insulin.
Biochem. J. 278, 771-777
126. Waldegger, S. (1998)
Physiologische und pathophysiologische Bedeutung zellvolumenregulatorischer Mechanismen.
Med. Habilitation, Universität Tübingen
127. Waldegger, S., Barth, P., Raber, G., Lang, F. (1997)
Cloning and characterization of a putative human serine/threonine protein kinase

- transcriptionally modified during anisotonic and isotonic alterations of cell volume.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 4440-4445
128. Waldegger, S., Busch, G. L., Kaba, N. K., Zempel, G., Ling, H., Heidland, A., Haussinger, D., Lang, F. (1997)
Effect of cellular hydration on protein metabolism.
Miner Electrolyte Metab 23, 201-205
129. Waldegger, S., Erdel, M., Nagl, U. O., Barth, P., Raber, G., Steuer, S., Utermann, G., Paulmichl, M., Lang, F. (1998)
Genomic organization and chromosomal localization of the human SGK protein kinase gene.
Genomics 51, 299-302
130. Waldegger, S., Klingel, K., Barth, P., Sauter, M., Lanzendörfer, M., Kandolf, R., Lang, F. (1999)
H-sgk serine-threonine protein kinase gene as transcriptional target of transforming growth factor beta in human intestine.
Gastroenterology 116, 1081-1088
131. Waldegger, S., Gabrysch, S., Barth, P., Lang, F. (2000)
H-sgk serine threonine protein kinase as transcriptional target of p38/MAP kinase pathway in HepG2 human hepatoma cells.
Cell Physiol Biochem 10, 203-208
132. Warskulat, U., Zhang, F., Häussinger, D. (1996)
Modulation of phagocytosis by anisoosmolarity and betaine in rat liver macrophages (Kupffer cells) and raw 264.7 mouse macrophages.
FEBS Lett. 391, 287-292
133. Watts, G. F., Playford, D. A. (1998)
Dyslipoproteinemia and hyperoxidation stress in the pathogenesis of endothelial dysfunction in non-insulin dependent diabetes mellitus : an hypothesis.
Atherosclerosis 141, 17-30
134. Watts, B. A. 3rd., Di Mari, J. F., Davis, R. J., Good, D. W. (1998)
Hypertonicity activates MAP kinases and inhibits HCO-3 absorption via distinct pathways in thick ascending limb.
Am J Physiol. 275, F 478-486

135. Way, K. J., Chou, E., King, G. L. (2000)
Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches.
TIPS 21, 181-187
136. Webster, M. K., Goya, L., Maiyar, A.C., Firestone, G. L. (1993)
Characterization of sgk, a novel member of the serine/threonine proteine kinase gene family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum.
Molecular and Cellular Biology 13, 2031-2040
137. Wesselborg, S., Bauer, M. K. A., Vogt, M., Schmitz, M. L., Schulze-Osthoff, K. (1997)
Activation of transcription factor NF-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase is mediated by distinct and separate stress effector pathways.
J Biol Chem. 272, 12422-12429
138. Whitmarsh, A. J., Davis, R. J. (1996)
Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways.
J. Mol. Med. 74, 589-607
139. Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B., Johnson, G. L. (1999)
Mitogen-activated protein kinase: conversation of a three-kinase module from yeast to human.
Physiol Rev 79, 143-180
140. Wilcox, R. A., Primrose, W. U., Nahorski, S. R., Challiss, R. A. (1998)
New developments in the molecular pharmacology of the myo-inositol 1,4,5-trisphosphate receptor.
Trends Pharmacol. Sci. 19, 467-475
141. Williams, B., Tsai, P., Schrier, R. W. (1992)
Glucose-induced downregulation of angiotensin II and arginine vasopressin receptors in cultured rat aortic vascular smooth muscle cells.
J. Clin. Invest. 90, 1992-1999
142. Williamson, J. R., Chang, K., Frangos, M., Hasan, K. S., Ido, Y., Kawamura, T., Nyengaardt, J. R., Van Den Enden, M., Kilo, C., Tilton, R.G. (1993)
Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications.
Diabetes 42, 801-813
143. Wohaiieb, S. A., Godin, D. V. (1987)
Alterations in tissue antioxidant systems in the spontaneously diabetic (BB Wistar)

- rat.
Can J Physiol Pharmacol 65, 2191-2195
144. Yamboliev, I. A., Wiesmann, K. M., Singer, C. A., Hedges, J. C., Gerthoffer, W. T. (2000)
Phosphatidylinositol 3-kinases regulate ERK and p38 MAP kinases in canine colonic smooth muscle.
Am J Physiol Cell Physiol 279, C352-C360
145. Yan, S.-D., Schmidt, A.-M., Anderson, G.M., Zhang, J., Brett, J., Zou, Y.-S., Pinsky, D., Stern, D. (1994)
Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins.
J Biol Chem. 269, 9889-9897
146. Zemel, M. B. (1998)
Nutritional and endocrine modulation of intracellular calcium: implications in obesity, insulin resistance and hypertension.
Mol Cell Biochem. 188, 129-136
147. Zervos, A. S., Faccio, L., Gatto, J. P., Kyriakis, J. M., Brent, R. (1995)
Mxi2, a mitogen-activated protein kinase that recognizes and phosphorylates Max protein.
Proc Natl Acad Sci USA 92, 10531-10534
148. Zhande, R., Brownsey, R. W. (1996)
Cell volume and the metabolic actions of insulin.
Biochem Cell Biol 74, 513-522
149. Zhang, S.-L., Tang, S.-S., Chen, X., Filep, J. R., Ingelfinger, J. R., Chan, J. S. D., (2000)
High levels of glucose stimulate angiotensinogen gene expression via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in rat kidney proximal cells.
Endocrinology 141, 4637-4646

Literaturverzeichnis

8. Danksagungen

Für die Bereitstellung des Themas, für wertvolle Ratschläge, belebende Diskussionen und unbegrenzte Unterstützung meiner Arbeit, möchte ich **Herrn Prof. Dr. Florian Lang** meinen größten Dank entgegenbringen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer **Herrn PD Dr. Siegfried Waldegger**, der mit unermüdlicher Geduld mir jederzeit für Fragen und Diskussionen zur Verfügung stand und außerordentlich zur Entstehung einer vertrauensvollen, angenehmen Atmosphäre beitrug.

Desweiteren möchte ich mich bei **allen Mitarbeitern des Instituts** bedanken, die durch ihre Arbeit und Hilfsbereitschaft zur Fertigstellung meiner Arbeit beitrugen, ganz besonders bei **Frau Petra Barth** für ihre geduldige Einführung in die molekularbiologische Methodik, **Frau Uta Hamacher** für die Bereitstellung der Zellkulturen und bei **Frau Sabine Gabrysch** für die vielen belebenden Diskussionen.

Meinen Freunden **Simone, Rebekka, Jens** und ganz besonders meinem Ehemann **Dirk Bartz** möchte ich ganz herzlichen Dank für ihre Unterstützung und Motivation in dieser Zeit entgegenbringen.

Nur scheinbar zuletzt möchte ich mich ausdrücklich bei **meinen Eltern** bedanken, die mir nicht nur mein Studium und diese Arbeit erst ermöglichten, sondern mich auch ansonsten in jeglicher Hinsicht unterstützten.

Danksagungen

9. Tabellarischer Lebenslauf

Martina Lanzendörfer

Persönliche Daten:

Name: Martina Lanzendörfer
Geburtsdatum: 12. Februar 1974
Geburtsort: Bietigheim
Familienstand: verheiratet

Schulbildung:

1980-1984: Grundschule in Ingersheim
1984-1993: Ellental-Gymnasium in Bietigheim-Bissingen
1993: Abitur
1993-1994: Freiwilliges soziales Jahr auf der Sozialstation in Ludwigsburg

Studium:

1994-1995: Studium der Biologie (Diplom) an der Universität Hohenheim
seit 1995: Studium der Humanmedizin an der
Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
03/ 1997: Physikum (mündl. Prüfung: Physiologie und Psychologie)
08/ 1998: 1. Staatsexamen
03/ 2000: 2. Staatsexamen (mündl. Prüfung: Dermatologie und Chirurgie)
23.05.2001: 3. Staatsexamen (Wahlfach: Psychiatrie, 4. Prüfungsfach: Kinder-
und Jugendpsychiatrie)
seit 1998: Stipendiatin der Studienstiftung des deutschen Volkes

Famulaturen/ Praktisches Jahr:

- 02-03/ 1998: Station A3 der Universitätsklinik für
Psychiatrie und Psychotherapie, Tübingen
- 03-04/ 1998: Neurologie am Virchow-Klinikum, Berlin
- 09-10/ 1998: Innere Medizin und Tropenmedizin am
Paul-Lechler-Krankenhaus, Tübingen
- 02-03/ 1999: Praxisfamulatur in der
Neurologischen Praxis Dr. Ullrich-Randecker, Reutlingen
- 08/ 1999: Neurologie am Sinai Hospital der
Johns Hopkins University, Baltimore, USA
- 04-08/ 2000: 1. PJ-Tertial an der Universitätsklinik für Psychiatrie und
Psychotherapie, Tübingen auf den Stationen A6 und A2
- 08-12/ 2000: 2. PJ-Tertial an der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen auf
der Station für Endokrinologie B2h
- 12/ 2000-
04/ 2001: 3. PJ-Tertial in der Allgemeinchirurgie an der
University of Tasmania, Hobart, Australien

Publikationen:

Lanzendörfer, M., Waldegger, S., Steuer, S., Nagl, U. O.,
Barth, P., Lang, F. (1998)
Induction of h-sgk serine-threonine protein kinase by glucose in
human endothelial cells.
Pflügers Arch. Eur. J. Physiol. 435, 86

Waldegger, S., Klingel, K., Barth, P., Sauter, M.,
Lanzendörfer, M., Kandolf, R., Lang, F. (1999)
h-sgk serine-threonine protein kinase gene as transcriptional
target of transforming growth factor β in human intestine.
Gastroenterology 116, 1081-1088

Lang, F., Klingel, K., Wagner, C. A., Stegen, C., Warntges, S.,
Friedrich, B., Lanzendorfer, M., Melzig, J., Moschen, I., Steuer, S.,
Waldegger, S., Sauter, M., Paulmichl, M., Gerke, V., Risler, T.,
Gamba, G., Capasso, G., Kandolf, R., Hebert, S. C., Massry, S. G.
Broer, S. (2000)

Deranged transcriptional regulation of cell-volume-sensitive kinase hSGK in diabetic nephropathy.
Proc Natl Acad Sci USA 97, 8157-62

Bartz, D., Gürvit, Ö., Lanzendörfer, M., Kopp, A., Kürtner, A.,
Straßer, W. (2001)
Virtual endoscopy for cardio vascular explorations.
Computer aided radiology and surgery, 960-964