Einfluss von Hypoxie und inflammatorischen Zytokinen auf die Adrenomedullingenexpression

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III
- BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN –
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
KARL-HEINZ HOFBAUER
aus Arnschwang
2001

Promotionsgesuch eingereicht am:	25.07.01
Diese Arbeit wurde angeleitet von:	Prof. Dr. Armin Kurtz
Prüfungsdatum:	29.10.01
Prüfungsausschuss:	
Vorsitzender:	Prof. Dr. Günter Hauska
1.Prüfer:	Prof. Dr. Armin Kurtz
2.Prüfer:	Prof. Dr. Horst Grobecker
3.Prüfer:	Prof. Dr. Will Minuth

Meinen Eltern

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Armin Kurtz für die Überlassung eines Arbeitsplatzes an seinem Lehrstuhl, für seine engagierte Betreuung der Arbeit, für seine Anregungen und seine ständige Hilfsbereitschaft. Seine Persönlichkeit und sein Optimismus half mir nach manchen von Fehlschlägen geprägten Versuchswochen trotzdem die Freude an der Forschung zu bewahren.

Mein ganz besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Peter Sandner für seine Einführung in die molekularbiologischen Methoden, für die Einarbeitung in das Forschungsgebiet Hypoxie und für seine engagierte und kompetente Diskussion der Versuchsergebnisse. Seine Kameradschaft und seine freundliche Art trugen ebenfalls wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Herrn Dr. Michael Bucher gebürt Dank für seine Diskussionsbereitschaft nicht nur in Fragestellungen zu Zytokinen und Sepsis.

Herrn Dr. Vladimir Todorov danke ich für die Diskussion methodischer Fragestellungen, seine Hilfsbereitschaft und Kameradschaft.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. Charlotte Wagner und Herrn Dr. Konrad Wolf für die Überlassung der ß-Aktin und EPO Plasmide und für deren Hilfsbereitschaft.

Meinen Kollegen Dr. Markus Müller, der mir die Methode der Mesangialzellpräparation zeigte, Dr. Hayo Castrop und Jürgen Klar danke ich für deren stete Unterstützung.

Herrn Bernhard Gess danke ich für die Unterstützung bei der Isolierung der Hepatozyten und für seine Hilfsbereitschaft. Frau Maggy Schweiger danke ich für die Einführung in den RNase Protection Assay. Mein besonderer Dank gilt auch Frau Marlies Hamann und Herrn Karlheinz Götz für die Unterstützung bei der Gewinnung der hypoxischen Organe.

Allen Mitarbeitern des Instituts, deren Name hier nicht ausdrücklich genannt wird, möchte ich für das angenehme Arbeitsklima danken.

INHALTSVERZEICHNIS.....5

1. EINLEITUNG..... 9

1.1. Struktur des Adrenomedullins.....9

1.2. Synthese des Adrenomedullins.....10

1.3. Die 5´-Region des Adrenomedullingenes.....11

1.4. Zelltyp- bzw. Gewebeverteilung der Adrenomedullin mRNA und des Adrenomedullins.....12

1.5. Speicherung, Freisetzung und Metabolisierung des Adrenomedullins.....14

1.6. Adrenomedullin Rezeptoren.....15
1.6.1. Die CGRP Rezeptoren.....15
1.6.2. ADM-R (Adrenomedullin - Rezeptor), L1 orphan receptor und RDC1 orphan receptor.....16
1.6.2.1. ADM-R (Adrenomedullin-Rezeptor).....16
1.6.2.2. L1 orphan receptor.....17
1.6.2.3. RDC1 orphan receptor.....17
1.6.3. Calcitonin Rezeptor-Like Rezeptor & Rezeptor Aktivität Modifizierendes Protein..17
1.6.3.1. Calcitonin Rezeptor-Like Rezeptor.....17
1.6.3.2. Rezeptor Aktivität Modifizierendes Protein (RAMP).....18

1.7. Signaltransduktion des Adrenomedullins.....19
1.7.1. Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP).....19
1.7.2. Phosphatidyl-4,5-diphosphat.....20
1.7.3. Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK).....21
1.7.4. Weitere Adrenomedullin abhängige Transduktionswege.....21

1.8. Wirkungen des Adrenomedullins auf Körpergewebe.....22

1.9. Hypoxie und Adrenomedullin.....23
1.9.1. ADM Genexpression unter Hypoxie.....23
1.9.2. Adrenomedullinrezeptoren und Hypoxie.....24

1.10. Zytokine und Adrenomedullin.....24
1.10.1. ADM Genexpression und Stickstoffmonoxid.....25

1.11. Ziele dieser Arbeit.....26

2. MATERIAL..... 27

2.1. Geräte.....27

2.2. Verbrauchsmaterialien.....28

2.3. Chemikalien.....29

2.4. Enzyme.....30

2.5. Vektoren 30

2.6. Lösungen 31
2.6.1. Zellkulturmedien 31
2.6.1.1. A7r5 AorticVascularSmoothMuscleCells (AVSMC) 31
2.6.1.2. Primärkulturen von glomerulären Mesangialzellen; glomeruläre Endothelzellen 31
2.6.1.3. Primärkulturen von Hepatozyten 31
2.6.2. Isolierung von Total RNA 32
2.6.3. RT/PCR und Klonierung 32
2.6.3.1. Puffer und Lösungen 32
2.6.3.2. Agarplatten und LB Medien 33
2.6.4. In vitro Transkription 34
2.6.5. RNase Protection Assay 34
2.6.6. Kommerzielle analytische Kits 35

3. METHODEN 36

3.1. In vivo Experimente 36
3.1.1. Tiere 36
3.1.2. Stimulation der Ratten mit anschließender Organentnahme 36

3.2. In vitro Experimente 37
3.2.1. Die Zelllinie A7r5 AVSMC 37
3.2.2. Gewinnung und Kultivierung von Primärkulturen von Rattenmesangialzellen 37
3.2.3. Präparation von Primärkulturen von Rattenhepatozyten 38
3.2.4. Die Kultivierung der glomerulären Endothelzelllinie 39

3.3. Isolierung von Total RNA 39
3.3.1. Isolierung von Total RNA aus Organen 39
3.3.2. Isolierung von Total RNA aus Zellen 40
3.3.3. Quantifizierung und Reinheit der isolierten RNA 40
3.3.4. Qualitätskontrolle der RNA 40

3.4. Quantifizierung der mRNA mit dem RNase Protection Assay 41
3.4.1. Herstellung der cDNA Fragmente durch RT- und PCR-Reaktion 42
3.4.1.1. Verwendete cDNA Plasmide 42
3.4.1.2. Klonierung des ADM-R Plasmids 42
3.4.1.2.1. Reverse Transkriptase (RT) Reaktion 43
3.4.1.2.2. Polymerase Kettenreaktion 43
3.4.1.2.3. Kontrolle der PCR Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese 44
3.4.1.3. Herstellung des ADM-R Klons 45
3.4.1.3.1. Ligation des ADM-R Fragments in den pCR®-II-TOPO Vektor 45
3.4.1.3.2. Transformation des ADM-R Plasmids in kompetente Bakterienzellen 45
3.4.1.3.3. Vermehrung der Klone 46
3.4.1.3.4. Isolierung von Plasmiden aus Bakterien im kleinen Maßstab („Mini Prep“) 46
3.4.1.3.5. Isolierung von Plasmiden aus Bakterien im großen Maßstab („Maxi Prep“) 47
3.4.1.3.6. Kontrollverdau der Plasmide 48
3.4.1.3.7. Glycerinkultur 49
3.4.1.3.8. Aufzeichnungsprotokolle 49

3.5. Die Methode des RNase Protection Assay 49
3.5.1. Linearisierung der Plasmide 49
3.5.2. Durchführung der „In vitro Transskription“ 50
3.5.3. Hybridisierung und RNase Protection Assay 51

3.5.4. Gelelektrophorese 52
3.5.5. Auswertung der Imagerdaten und Entwicklung der Röntgenfilme 52

3.6. RNase Protection Assays 53
3.6.1. ADM & ADM-R....53
3.6.1.1. RNase Protection Assay für ADM und ADM-R 53
3.6.1.2. Eingesetzte RNA Mengen für die ADM und ADM-R Sonden.... 53
3.6.2. ß-Aktin 54
3.6.2.1. ß-Aktin RNase Protection Assays.... 54
3.6.2.2. Eingesetzte RNA Mengen für die Aktin Sonde 54
3.6.3. Erythropoietin 54
3.6.3.1. EPO Protection Assays 54
3.6.3.2. Eingesetzte RNA Mengen für die EPO Sonde.... 55
3.6.4. Induzierbare NO Synthase (iNOS) 55
3.6.4.1. I-NOS RNase Protection Assay 55
3.6.4.2. Eingesetzte RNA Mengen für die iNOS Sonde 55

3.7. Proteinbestimmung....56
3.7.1. Bestimmung von Adrenomedullin im Blutplasma der Ratte....56
3.7.2. Adrenomedullinbestimmung in verschiedenen Rattengeweben....56

3.8. Bestimmung des cGMP Gehaltes in A7r5 AVSMC....56

3.9. Statistik 57

4. ERGEBNISSE 58

4.1. Einfluss von Hypoxie auf das ADM System 58
4.1.1. In vivo Ergebnisse 58
4.1.1.1. Basale ADM mRNA und ADM-R mRNA Expression 58
4.1.1.2. Einfluss von Hypoxie auf die ADM mRNA und ADM-R mRNA Genexpression 60
4.1.1.2.1. Einfluss von Hypoxie auf die Erythropoietin (EPO) mRNA Genexpression in der Niere und in der Leber....60
4.1.1.2.2. Einfluss von Hypoxie auf die ADM und ADM-R mRNA Expression in der Niere und Leber 61
4.1.1.2.3. Einfluss von Hypoxie auf die ADM und ADM-R mRNA in Lunge, Herz, Gehirn, Aorta und Nebenniere....62
4.1.1.2.4. Einfluss von Hypoxie auf die ADM und ADM-R mRNA Expression in den Nierenzonen....64
4.1.1.3. Proteinbestimmung des Adrenomedullins 67
4.1.2. In vitro Ergebnisse: Adrenomedullin mRNA Expression in Primärzellkulturen und Zelllinien unter Hypoxie....68
4.1.2.1. Einfluss von Hypoxie auf die Adrenomedullin mRNA Abundanz in A7r5 AVSMC 69
4.1.2.2. ADM mRNA Expression in Primärkulturen von Hepatozyten und glomerulären Mesangialzellen sowie in der Zelllinie von glomerulären Endothelzellen 70

4.2. Einfluss von Zytokinen auf das ADM System....72
4.2.1. Einfluss der Zytokin-(3)-kombination auf die Genexpression in A7r5 AVSMC.....73
4.2.1.1. Einfluss der Zytokin-(3)-kombination auf die ADM mRNA Expression in A7r5 AVSMC 73
4.2.1.2. Einfluss der Zytokin-(3)-kombination auf die iNOS mRNA Genexpression in A7r5 AVSMC 74
4.2.1.3. Einfluss des NOS Inhibitors L-NAME auf die durch die Zytokin-(3)-kombination induzierte ADM mRNA Expression in A7r5 AVSMC 75
4.2.1.4. Einfluss von NO auf die ADM mRNA Expression in A7r5 AVSMC.... 77

4.2.1.5. Einfluss von NO auf die ADM mRNA Expression in weiteren Zelltypen 79
4.2.1.6. Messung von cGMP in A7r5 AVSMC 81
4.2.1.7. Einfluss von 8-Bromo-cGMP auf die ADM mRNA Expression in A7r5 AVSMC 81
4.2.1.8. Einfluss von ODQ auf die ADM mRNA Expression in A7r5 AVSMC 82
4.2.1.9. Einfluss der einzelnen Zytokine auf die ADM mRNA Expression in A7r5 AVSMC 84
4.2.1.10. Einfluss von 2er Zytokinkombinationen auf die ADM mRNA Expression in A7r5 AVSMC 87

4.3. Gemeinsamer Einfluss von Hypoxie und Zytokinen auf die ADM mRNA Expression in A7r5 AVSMC 90
4.3.1. Wirkung von Hypoxie und der Zytokin-(3)-kombination auf die ADM mRNA Expression in A7r5 AVSMC 91
4.3.2. Wirkung von Hypoxie und NO Donoren auf die ADM mRNA Expression in A7r5 AVSMC 94

5. DISKUSSION 98

5.1 Einfluss von Hypoxie auf das ADM System 98
5.1.1. Physiologische Verteilung von ADM und ADM-R mRNA bzw. ADM Protein unter Normoxie 98
5.1.2. Einfluss von Hypoxie auf die ADM Genexpression 99
5.1.2.1. Organe und Aorta 99
5.1.2.2. Nierenkortex, äußeres und inneres Nierenmark 100
5.1.2.3. Zellkulturbefunde 101
5.1.3. Einfluss von Hypoxie auf die ADM-R mRNA Expression in vivo 102
5.1.4. Schlussfolgerung 103

5.2. Einfluss von Zytokinen auf das ADM System 104
5.2.1. Einfluss von Zytokinen und NO auf die ADM Genexpression 104
5.2.2. Einfluss von Zytokinen und NO unabhängiger Effekte auf die ADM Genexpression 105
5.2.3. Schlussfolgerung 106

5.3. Einfluss von Hypoxie und Zytokinen auf die ADM Genexpression 107

5.4. Zusammenfassung 109

6. LITERATURVERZEICHNIS 111

7. ABBKÜRZUNGSVERZEICHNIS 127

8. ANHANG 130

Publikationen 130

Lebenslauf 131

1. Einleitung

Adrenomedullin (ADM) wurde 1993 in einem humanen Phäochromocytomextrakt entdeckt und in weiteren Untersuchungen als ein blutdrucksenkender Faktor (Kitamura et al. 1993A) beschrieben. Obgleich die physiologische Bedeutung des Adrenomedullins noch nicht vollständig geklärt ist, sind dennoch einige biologische Wirkungen beschrieben worden. Neben einer vasodilatierenden, natriuretischen und diuretischen Wirkung (Jougasaki et al. 1995A, Edwards et al. 1997) wurden auch die Inhibierung der Aldosteronsekretion (Andreis et al. 1998), eine verminderte Mitogenese (Chini et al. 1997) oder eine verstärkte Tumorzellproliferation dem ADM als Wirkung zugeordnet (Miller et al. 1996, Martinez et al. 1997). Auch wurden während verschiedener pathologischer Zustände erhöhte Plasmaadrenomedullinspiegel gefunden. So wurden während der Hypertonie (Cheung et al. 1997, Kohno et al. 1996, Tanaka et al. 1995), bei kardialen (Romppannen et al. 1997, ∅ie et al. 2000, Jougasaki et al. 1995B), hepatischen, respiratorischen und renalen Erkrankungen (Cheung et al. 1997), während malignem Tumorwachstum (Nakayama et al. 1998A, Garayoa et al. 2000) und bei entzündlichen Erkrankungen (Ueda et al. 1999, Zhou et al. 1999) gesteigerte ADM Werte gefunden. Durch welche Faktoren die ADM Genexpression und damit die Synthese des ADM gesteuert wird, ist bisher noch wenig untersucht.

1.1. Struktur des Adrenomedullins

Das Adrenomedullin besteht je nach Spezies aus 50 - 52 Aminosäuren, bildet zwischen den Cysteinen an Position 16 und 21 eine intramolekulare Disulfidbrücke aus und das Carboxylende bildende Tyrosin (Y) ist amidiert (Sakata et al 1993). Abbildung 1 zeigt die jeweilige artspezifische Aminosäuresequenz des Adrenomedullins und zeigt Unterschiede in der Aminosäuresequenz zwischen den einzelnen Spezies. Die Aminosäuresequenzen und damit die Nucleotidsequenzen unterscheiden sich nur wenig voneinander.

| | | |

Die Abbildung 2 zeigt ein Schema des humanen Adrenomedullingenes mit einem Teil des Promotorbereichs und den Ablauf der Genexpression von der Transkription bis hin zur posttranslationalen Bildung des ADMs. Das Adrenomedullingen des Menschen ist auf Chromosom 11 lokalisiert und besteht aus 4 Exons und 3 Introns (Ishimitsu et al. 1994), die nach Transkription und Translation zu einem aus 185 Aminosäuren (AS) bestehenden Protein führen, das als Preproadrenomedullin (PreproADM) bezeichnet wird. Die Entfernung des Signalpeptides durch Spaltung des Threonins an Position (Pos.) 21 und des Alanins an Pos. 22 führt zur biologisch inaktiven Zwischenstufe Proadrenomedullin (ProADM) (164 AS), aus der posttranslational mehrere Proteine gebildet werden. So entsteht das Adrenomedullin (52 AS) durch Spaltung der Aminosäuren Lysin – Arginin (Pos. 93 & 94) und Arginin – Arginin (Pos. 148 & 149) und das Proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP, 20 As) durch Spaltung an Pos. 43 (Lysin) und Pos. 44 (Arginin). Diese beiden Peptide sind die biologisch aktiven Proteine des Adrenomedullingens. Über die biologische Aktivität der anderen gebildeten Proteinfragmente [Adrenotensin (= PreproADM 153-185) und PreproADM 45-92] (Gumusel et al 1995) ist bisher sehr wenig bekannt. So beschreibt Gumusel et al. (1995, 1996) das Adrenotensin als einen Gegenspieler zum Adrenomedullin.

1.3. Die 5´-Region des Adrenomedullingenes

Die 5´Region eines Genes enthält neben den charakteristischen Basensequenzen, die für die Bindung der DNA abhängigen RNA Polymerase notwendig sind, noch weitere DNA-Bindungsstellen, an die eine Reihe von Transkriptionsfaktoren binden und dadurch die Transkription kontrollieren können. Die 5´Region des ADM Genes (vgl. Abb. 3) weist viele mögliche DNA-Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie für das activator protein-2 [(AP-2) wird eine Regulation der Transkriptionsaktivität über Proteinkinase C (PKC) und cAMP zugeordnet (Imagawa et al. 1987)] bei -670, -682, -784, -793 und –1001, für cAMP [aktiviert das cAMP-regulated Element (CRE) (Fink et al. 1988)] bei (-280), für das activator protein-1 (AP-1) (Lee et al. 1987) bei –1549 und –1801, für den Nuklearen Faktor κB (NF-κB) (Hattori et al. 1999) bei –825 und -905 und für HIF 1bei –1429, -1463 und –1807 [HIF-1 bindet an das Hypoxia responsive element (HRE)] auf. Besonders das Vorhandensein mehrerer möglicher DNA Bindungsstellen für HIF-1 und für NF kappa B weist auf eine mögliche Aktivierung des ADM Genes durch Hypoxie und Zytokine hin.

Ausschnitt der 5´flankierenden Nukleotidsequenz + Intron1 des Adrenomedullingens

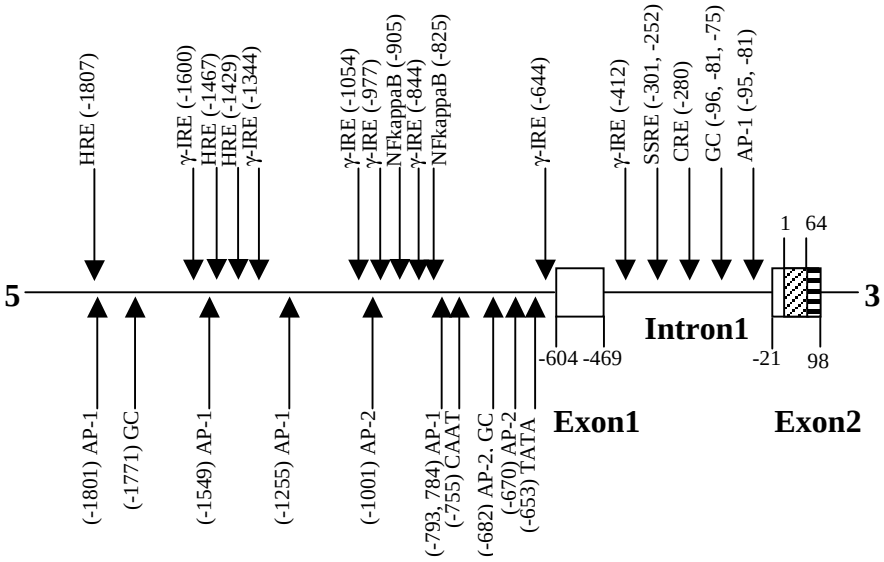

Abbildung 3: Der Transkriptionsstartpunkt des humanen Adrenomedullingens liegt bei –604 auf dem Exon 1. Die Zahl +1 auf dem Exon 2 gibt den Startpunkt für die Translation des Preproadrenomedullins an. Auf dem Intron 1 und in 5´Richtung des Exon 1 sind mehrere mögliche DNA-Bindungstellen für die Regulation der Genexpression vorhanden. AP-1, (activator protein-1); AP-2, (activator protein-2); CRE, (cAMP regulated element); γ-IRE, (γ-Interferon responsive element); SSRE, (Shear stress responsive element) (Hinson et al.2000). Zusätzlich sind 3 mögliche HRE´s (Hypoxia responsive elements) aus der Publikation von Cormier-Regard et al. (1998) und zwei mögliche Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor NF kappa B aus der Publikation von Hattori et al. (1999) in die 5´Region eingezeichnet.

1.4. Zelltyp- bzw. Gewebeverteilung der Adrenomedullin mRNA und des Adrenomedullins

Neben einer hohen ADM mRNA Expression im Phäochromocytomgewebe und in der gesunden Nebenniere (Kitamura et al. 1993A) wurde in allen Körpergeweben ADM - Transkript detektiert. Hohe ADM mRNA Werte wurden auch im Herz-, Nieren - und Lungengewebe (Kitamura et al. 1993B, Ichiki et al. 1994, Washimine et al. 1995, Satoh et al. 1996) gefunden. Hervorzuheben ist die Entdeckung von Sugo et al. (1994A), dass Gefäßendothelzellen eine höhere Adrenomedullin Genexpression als die Nebennieren aufweisen. Aufgrund dieses Befundes wird ADM neben EDRF und Endothelin als ein vom Gefäßendothel sezerniertes Protein betrachtet. Außer bei Gefäßendothelzellen gelang auch bei fast allen Zelltypen der mRNA bzw. Proteinnachweis (Referenzen sind in der Tabelle der Abbildung 4).

Zelltyp/Gewebe	Spezies	Methode	Referenz
Kardiovasculäres System			
Gefäßendothelzellen	Mensch, Ratte, Rind, Schwein	RIA/mRNA-Analyse	Sugo et al. 1994A
Glatte Gefäßmuskelzellen	Ratte, Rind	RIA/mRNA-Analyse	Sugo et al. 1994B, 1995
Herzvorhof und Herzkammer	Hund	IHC	Jougasaki et al. 1995A
Umbilical Venenendothelzellen	Mensch	RIA/mRNA-Analyse	Ishihara et al. 1997
Kardiomyozyten	Ratte (neonatal)	mRNA-Analyse	Tsuruda et al. 1998, Nishimori et al. 1997
Endocrines System			
Zona glomerulosa	Ratte	IHC/ISH	Kapas et al. 1998
Adrenocortikale Zellen	Mensch	mRNA-Analyse	Liu et al. 1997
Nebennierenzelllinie SW13	Mensch	RIA/mRNA-Analyse	Takahashi et al. 1998
Chromaffine Zellen	Ratte	IHC	Mulder et al. 1996
	Mensch	IHC	Satoh et al. 1996
Phäochromacytom	Mensch	mRNA-Analyse	Liu et al. 1997
Hypophysenhinterlappen	Ratte	ISH	Cameron et al. 1998
Zentrales Nervensystem			
Paraventrikulärer Nucleus	Mensch	IHC	Satoh et al. 1996
	Ratte	IHC	Ueta et al. 1995
Supraoptic Nucleus	Mensch	IHC	Satoh et al. 1996
	Ratte	IHC	Utea et al. 1995
Infundibulärer Nucleus	Mensch	IHC	Satoh et al. 1996
Astrocyten	Ratte	mRNA-Analyse	Kuchinke et al. 1995
Glioblastomzelllinie T98G & A172	Mensch	RIA/mRNA-Analyse	Takahashi et al. 1997
Blut			
Makrophagen	Maus	RIA/mRNA-Analyse	Kubo et al. 1998A
	Mensch	RIA	Kubo et al. 1998B
Zelllinie RAW264-7	Maus	RIA/mRNA-Analyse	Kubo et al. 1998A
Zelllinien THP-1 und HL60 Granulozyten Lymphozyten Monozyten	Mensch	RIA	Kubo et al. 1998B
Niere			
Mesangialzellen	Mensch	RIA/mRNA-Analyse	Lai et al. 1998
	Ratte	RIA	Michibata et al. 1998
	Ratte	mRNA-Analyse	Owada et al. 1997
Glomeruläre Epithelzellen	Mensch	RIA/mRNA-Analyse	Lai et al. 1998
	Maus	ISH	Cameron et al. 1998
	Ratte	mRNA-Analyse	Jensen et al. 1998
	Hund	IHC	Jougasaki et al. 1995A
Distaler Tubulus	Hund	IHC	Jougasaki et al. 1995A
Collecting duct	Hund	IHC	Jougasaki et al.1995A
	Ratte	mRNA-Analyse	Owada et al. 1997
Renale Tubulus Zelllinien MDCK	Hund	RIA	Sato et al. 1998
LLCPK1	Schwein		
MDBK	Rind		
Respiratorisches System			
Bronchialepithel	Mensch (fetal)	IHC	Marinoni et al. 1999
	Maus	ISH	Cameron et al. 1998
Columnar Epithel Parasympathische Neuronen Chondrozyten Alveolare Makrophagen Glatte Gefäßmuskelzellen	Mensch	IHC	Martinez et al. 1995
Reproduktives System			
Granulosa Zellen	Ratte	mRNA-Analyse	Abe et al. 1998
Plazentale Trophoblasten	Mensch	IHC	Marioni et al. 1998
Endometriales Epithel	Mensch	IHC	Michishita et al. 1999
	Maus	ISH	Cameron et al. 1998
Endometriale Makrophagen	Mensch	IHC	Zhao et al. 1998
Mammary ductale Zellen	Maus	IHC	Jahnke et al. 1997
Haut			
Hautepithel Keratinozyten Haarfolikel	Mensch	IHC/ISH	Martinez et al. 1997

Hautzelllinien: CRL7922 CRL7729 CRL7585 CRL7687	Mensch	Western Blot/mRNA-Analyse	Martinez et al. 1997
Gastrointestinaler Trakt			
Epithelzellen	Maus	ISH	Cameron et al. 1998
Colorektale Karzinomzelllinie DLD-1	Mensch	RIA/mRNA-Analyse	Nakayama et al. 1998A, Nakayama et al. 1998B
Enterochromaffine Zellen	Ratte	IHC	Mulder et al. 1996
Pankreas	Ratte	IHC	Martinez et al.1998
Gastric mucosa	Ratte	ISH	Tomikawa et al. 1998
Fibroblasten			
Rat-2	Ratte	RIA	Coppock et al. 1999
Swiss 3T3 Zellen	Maus		
Hs68	Mensch	RIA	Isumi et al. 1998A
NHLF	Mensch		

Abbildung 4: Adrenomedullingenexpression oder Adrenomedullin-Immunoreaktivität in verschiedenen Zelltypen bzw. Geweben. Daten der Tabelle stammen von Hinson et al. (2000). IHC, Immunhistochemie; ISH, *in situ* Hybridisierung; RIA, Radio Immuno Assay;

1.5. Speicherung, Freisetzung und Metabolisierung des Adrenomedullins

Bisher sind nur wenige Daten zur Speicherung, Freisetzung und Metabolisierung des Adrenomedullins verfügbar.

Die Frage nach der Speicherung des Adrenomedullins konnte bis heute nicht beantwortet werden. Eine mögliche Speicherung des ADMs in sekretorischen Granula ist bisher nur in der Bauchspeicheldrüse beschrieben worden (Martinez et al. 1996). In anderen Geweben fand sich bis jetzt kein Hinweis auf die Speicherung des ADMs und so wird davon ausgegangen, dass ADM konstitutiv sezerniert wird (Isumi et al. 1998B, Sugo et al. 1994B). So findet auch Takahashi et al. (1998) bei seinem Vergleich des Adrenomedullingehalts in adrenocortikalen Tumorzellen und der Proteinkonzentration im Mediumüberstand keinen Hinweis für eine Speicherung.

Das sezernierte Adrenomedullin wurde von Kitamura et al. (1998) näher untersucht. Mit Hilfe eines von ihm entwickelten RIA-Systems zeigte er, dass im Blutplasma zwei verschiedene ADM Formen zirkulieren, nämlich Glycin - ADM (53 AS) (ADM-gly) und ADM (52 AS). Kitamura et al. (1998) fand im Plasma von gesunden Patienten ein Verhältnis ADM-gly zu ADM von 2,7±0,18 fmol/ml zu 0,48±0,05 fmol/ml. Die Plasmahalbwertszeit des Adrenomedullins beträgt 22,0±1,6 min mit einer metabolischen Clearance von 27,4±3,6 ml/kg*min und einem Verteilungsvolumen von 880±150 ml/kg (Meeran et al. 1997). Die Metabolisierung des ADMs erfolgt durch an die Plasmamembran gebundene Enzyme. Zum

einen führt eine Metalloprotease zur Bildung von (8-52 AS), (26-52 AS) und (33-52 AS) Adrenomedullinfragmenten, zum anderen spaltet eine Aminopeptidase das hADM in (2-52 AS), (27-52 AS) und (28-52 AS) große hADM - Bruchstücke (Lewis et al. 1997).

1.6. Adrenomedullin Rezeptoren

1.6.1. Die CGRP Rezeptoren

Die Homologie des ADMs zum Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP) (beide besitzen die Sechs-Ring-Struktur) und die vasodilatierende Eigenschaft der beiden Proteine führte dazu, dass die $CGRP_1$- und $CGRP_2$-Rezeptoren die ersten Rezeptoren waren, die auf eine Affinität für ADM untersucht wurden. Der CGRP-Rezeptorantagonist $CGRP_{\mathbf{8\text{-}37}}$ (Dennis et al. 1990, Chiba et al. 1989) eignet sich zur Blockade und zur Unterscheidung der beiden CGRP-Rezeptorsubtypen (Poyner et al. 1997). In zahlreichen Studien konnten die Gefäßwirkungen des ADMs bzw. des CGRPs durch den CGRP-Rezeptorantagonisten $CGRP_{\mathbf{8\text{-}37}}$ aufgehoben werden. So zeigte Nuki et al. (1993), dass sich die vasodilatierenden Effekte von ADM und CGRP auf das mesenteriale Gefäßsystem der Ratte (Prototyp einer $CGRP_1$ Präperation) durch $CGRP_{\mathbf{8\text{-}37}}$ blockieren lasssen. Eine ähnliche Wirkung auf die ADM bzw. CGRP induzierte Vasodilatation hatte $CGRP_{\mathbf{8\text{-}37}}$ in einer Präparation des isolierten Rattenherzens (Entzeroth et al. 1995) und im Mikro-Gefäßsystem der Ratte bzw. des Hamsters (Hall et al. 1995). Zudem zeigte ADM in SK-N-MC Zellen (einer humanen Neuroblastomzelllinie, die $CGRP_1$-Rezeptoren exprimiert) eine hohe Bindungsfähigkeit an CGRP Rezeptoren (Entzeroth et al. 1995, Zimmermann et al. 1995). Ein Vergleich der Bindungsfähigkeit von ADM und CGRP ist in der Publikation von Zimmermann et al. (1995) zu finden, in der ADM eine siebenfach geringere Affinität zu CGRP Rezeptoren hatte als CGRP selbst (IC_{50} = 2,0 vs. 0,3 nM). Die Bindung von ADM an CGRP Rezeptoren zeigen auch etliche Bindungsstudienstudien, bei denen ^{125}I-CGRP mit steigenden ADM-Konzentrationen aus seiner Rezeptorbindung verdrängt wurde. So verdrängte ADM in Lungen- bzw. Herzmembranen der Ratte (Owji et al. 1995), im Gehirn der Ratte (van-Rossum et al. 1995), in SK-N-MC (Entzeroth et al. 1995, Zimmermann et al. 1995, Vine et al. 1996), in der Aorta der Ratte (Nandha et al. 1996) und im vas deferens des Meerschweinchens (Poyner et al. 1999) ^{125}I-CGRP aus der Rezeptorbindung. Das vas deferens des Meerschweinchens ist zudem ein Modell für die Charakterisierung des $CGRP_2$ Rezeptors (Poyner et al. 1999) und es konnte mit diesem

Modell gezeigt werden, dass ADM mit einer IC_{50} von 129 nM für die $CGRP_2$ Rezeptorbindung viel schwächer an den $CGRP_2$ Rezeptor als an den $CGRP_1$ Rezeptor bindet. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Adrenomedullin für CGRP Rezeptoren als ein Effektorprotein agieren kann, wenn auch mit geringerer Affinität als CGRP.

1.6.2. ADM-R (Adrenomedullin - Rezeptor), L1 orphan receptor und RDC1 orphan receptor

In vivo Studien (Nandha et al. 1996, Champion et al. 1996, Hjelmqvist et al. 1997) zeigten, dass der CGRP Rezeptorantagonist $CGRP_{\mathbf{8\text{-}37}}$ die durch ADM ausgelösten Wirkungen nicht inhibieren konnte, aber dass die CGRP Wirkungen durch $CGRP_{\mathbf{8\text{-}37}}$ blockiert werden konnten. Eguchi et al. (1994) beschrieb in seiner in vitro Studie an glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte, dass gebundenes radioaktives ^{125}I-Adrenomedullin (Ratte) mit Adrenomedullin (Ratte) aus seiner Rezeptorbindung mit einer Dissoziationskonstante von KD = 13nM verdrängt werden kann. Die dafür notwendige CGRP (Ratte) Konzentration war jedoch mit einer Inhibierungskonstante K_i von 300nM circa 23 mal höher. Diese Ergebnisse waren untypisch für einen CGRP Rezeptor und ließen vermuten, dass für ADM noch weitere spezifischere Rezeptoren existieren. In einer anderen Studie (Ishizaka et al. 1994) wurde der cAMP-Spiegel in glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte durch humanes Adrenomedullin mit einer EC_{50} von 20nM im Vergleich zu CGRP mit einer EC_{50} von 8,5nM gesteigert. In beiden Studien (Eguchi et al. 1994, Ishizaka et al. 1994) konnte humanes ^{125}I-Adrenomedullin, das mit einer IC_{50} von 73nM an diese Zellen bindet, weder durch hohe CGRP- (>10µM) noch durch hohe $CGRP_{\mathbf{8\text{-}37}}$-Konzentrationen (>10µM) aus seiner Rezeptorbindung verdrängt werden.

1.6.2.1. ADM-R (Adrenomedullin-Rezeptor)

Ein von Kapas et al. (1995A) klonierter Rezeptor (Ratte) zeigte nach der Transfektion in COS-7 Zellen einen cAMP Anstieg bei der Inkubation mit ADM (EC_{50} = 7nM). Eine Transfektion ohne die klonierte Rezeptor DNA und eine Inkubation mit CGRP in der sehr hohen Konzentration von 1000nM bewirkte dagegen keinen cAMP Anstieg. Eine Northern Blot - Bestimmung der ADM-R mRNA Verteilung in verschiedenen Geweben der Ratte ergab interessanterweise eine ähnliche Verteilung wie die der ADM Bindungsstellen in der

Studie von Owji et al. (1995), wobei die größte Expression in der Lunge gefunden wurde. Somit ist der von Kapas et al. (1995A) sieben transmembranäre G-Protein gekoppelte Rezeptor [**ADM-R**] (395 AS) ein Rezeptor mit einer Affinität für ADM.

1.6.2.2. L1 orphan receptor

Ein Sequenzvergleich der von Kapas et al. (1995A) entdeckten Rezeptor DNA Sequenz ergab, dass eine cDNA, die einen ebenfalls sieben transmembranären G-Protein gekoppelten 395 AS langen Rezeptor kodiert, mit der obigen cDNA fast vollständig übereinstimmt. Der von der cDNA exprimierte Rezeptor wurde als „**L1 orphan receptor**“ (Eva et al. 1993) [auch als G10d aus der Rattenleber (Harrison et al. 1993) bekannt, Genbank accession number L04672] bezeichnet.

1.6.2.3. RDC1 orphan receptor

Eine weitere cDNA Sequenz mit 30%iger Homologie zu der cDNA von Kapas et al. (1995A) stellt ein als **RDC1** (Libert et al. 1990) bezeichneter sieben transmembranärer Rezeptor dar [Genbank accession number X14048]. Die cDNA des RDC1 wurde aus Schilddrüsengewebe des Hundes kloniert (Libert et al. 1990). Eine Expression des RDC1 in COS-7 Zellen ergab eine Pharmakologie, die für einen $CGRP_1$ Rezeptor typisch war (Kapas et al. 1995A).

1.6.3. Calcitonin Rezeptor-Like Rezeptor & Rezeptor Aktivität Modifizierendes Protein

1.6.3.1. Calcitonin Rezeptor-Like Rezeptor

Njuki et al. (1993) klonierte aus der mRNA von Hypothalamusgewebe der Ratte mit Hilfe von Primern, die sich vom Calcitoninrezeptor des Schweines und vom PTH Rezeptor des Opossums ableiten, einen Rezeptor, der als **Calcitonin Rezeptor Like Rezeptor (CRLR)** bezeichnet wurde [Genbank accession number X70658]. Fluhmann et al. (1995) klonierte ausgehend vom menschlichen Kleinhirn die vollständige cDNA Sequenz des humanen (h)

CRLR [Genbank accession number U17473]. Der hCRLR ist ein aus 461 AS bestehendes Protein, das eine 91%ige Homologie mit dem CRLR der Ratte (r) und eine 51%ige Homologie mit dem humanen Calcitonin Rezeptor aufweist. Die Expression des hCRLR in COS-7 Zellen führte zu keiner Bindung der verschiedenen Mitglieder der Calcitoninfamilie und der hCRLR wurde daher als „orphan“ (= Waisen) Rezeptor bezeichnet. Schließlich zeigten Aiyar und Mitarbeiter (1996), dass der hCRLR nach stabiler Transfektion in human embryonic kidney (HEK) 293 Zellen eine Pharmakologie wie ein $CGRP_1$ Rezeptor aufwies. Der rCRLR (Han et al. 1997) und der CRLR des Schweins (Elshourbagy et al. 1998) zeigten nach stabiler Transfektion in HEK 293 Zellen ebenfalls eine $CGRP_1$ Rezeptor Pharmakologie und bekräftigen die Ergebnisse von Aiyar (1996). Daraufhin tauchte die Frage auf, was für ein Faktor dafür verantwortlich ist, warum in den HEK 293 Zellen der transfizierte CRLR als $CGRP_1$ Rezeptor fungiert, aber diese Funktion nicht in COS-7 Zellen ausübt?

1.6.3.2. Rezeptor Aktivität Modifizierendes Protein (RAMP)

Eine Antwort auf obige Frage fanden McLatchie et al. (1998), indem sie eine neue Rezeptorfamilie identifizierte, die aus den drei Rezeptor Aktivität Modifizierenden Proteinen (RAMP) 1, 2 und 3 besteht. Dabei handelt es sich um einfache transmembranäre Proteine, die zusammen mit dem CRLR exprimiert werden. Es wurde gezeigt, dass die einzelnen RAMPs den CRLR an die Zelloberfläche transportieren und dort mit dem CRLR assoziieren und dessen pharmakologisches Profil bedingen. So ergibt in der McLatchie-Studie die Kombination aus CRLR und RAMP1 einen funktionellen CGRP Rezeptor, die Kombination mit RAMP2 oder 3 einen funktionellen Adrenomedullinrezeptor (Mc Latchie et al. 1998). Gezeigt wurde dies durch eine gemeinsame oder getrennte Transfektion des hCRLR und RAMP1 in HEK 293**T** Zellen [HEK 293**T** Zellen exprimieren im Gegensatz zu manchen HEK 293 Zelllinien keine endogenen CGRP Rezeptoren (Han et al. 1997)], indem nur die gemeinsame Transfektion zu einer ^{125}I-CGRP Bindung und zu einem deutlichen cAMP-Anstieg führte. Auch zeigte die Kombination aus hCRLR und RAMP1 in HEK 293**T** Zellen ein ähnliches pharmakologisches Profil wie die CGRP Rezeptoren in SK-N-MC Zellen (Mc Latchie et al. 1998). So ist auch die fehlende CGRP Bindung in COS-7 Zellen erklärbar, indem angenommen wird, das kein endogenes RAMP1 in den COS-7 Zellen exprimiert wird. Die Koexpression von CRLR und RAMP2 in Oozyten oder in HEK 293**T** Zellen zeigte eine

typische Adrenomedullin Rezeptor Pharmakologie, wobei CGRP ohne Wirkung war (Mc Latchie et al. 1998).

Eine Betrachtung der bisherigen Publikationen zum Thema der Adrenomedullin Rezeptoren zeigt, dass zwar viele Wirkungen des Adrenomedullins mit den bisher klassifizierten Rezeptoren CGRP1&2, ADMR bzw. L1, RDC1, CRLR/RAMP2 & CRLR/RAMP3 erklärt werden können, aber in Einzelfällen passen bestimmte Adrenomedullin bzw. CGRP Bindungswerte nicht zu den gefundenen Rezeptor mRNA Werten. So ist z.B. im Rückenmark keine L1, RDC1 und CRLR mRNA nachweisbar (Oliver et al. 1998), obwohl ADM und CGRP in diesem Gewebe eine hohe Bindung aufweisen (Owji et al. 1996). Die Studie von Oliver et al. (1998) beschäftigt sich auch mit der L1, RDC1 und CRLR mRNA Verteilung im Gehirn der Ratte. Die gefundene Rezeptor mRNA Verteilung in den einzelnen Teilen des Gehirns kann die von anderen Autoren berichteten ADM bzw. CGRP Bindungswerte nur in einigen Gehirnarealen erklären (Owji et al. 1996, van-Rossum et al. 1997, Sone et al. 1997). Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass noch weitere Rezeptoren mit einer Affinität für ADM auf ihre Entdeckung warten, da bisher zu wenig Studien durchgeführt wurden, die sich mit der RDC1, L1 und CRLR Verteilung und Expression und deren Korrelation zu der ADM bzw. CGRP Bindung befassen und bisher keine selektiven Antagonisten für ADM bzw. CGRP zur Verfügung stehen.

1.7. Signaltransduktion des Adrenomedullins

1.7.1. Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP)

Ein Merkmal der G-Protein gekoppelten Rezeptoren ist die Assoziation des G-Proteins mit den Enzymen Adenylatcyclase (AC), Guanylatcyclase (GC) bzw. Phospholipase C (PLC). Diese Enzyme katalysieren die Bildung der second messenger Moleküle cAMP, cGMP bzw. die Spaltung von Phosphatidyl-4,5-diphosphat in Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). Bei den bisher identifizierten Rezeptoren für Adrenomedullin (CGRP1&2, L1, RDC1 und CRLR) handelt es sich ausschließlich um sieben transmembranäre G-Protein gekoppelte Rezeptoren, deren Transfektion in Zellen immer mit

erhöhten cAMP – Spiegeln assoziiert war (Kapas et al. 1995B, Aiyar et al. 1996, Han et al. 1997, Mc Latchie et al. 1998, Muff et al. 1998). Schließlich zeigen viele Zellkulturstudien, dass der Haupteffekt von mit Adrenomedullin stimulierten Zellen eine Erhöhung der **cAMP** Spiegel ist (Shimekake et al. 1995, Zimmmermann et al. 1995, Withers et al. 1996, Yeung et al. 1996, Jensen et al. 1997, Kapas et al. 1997, Moody et al. 1997, Takahashi et al. 1997, Nishikimi et al. 1998, Coppock et al. 1999). Auch sollte nicht vergessen werden, dass der eigentliche Grund der zur Entdeckung des Adrenomedullins führte, letztendlich eine Suche nach Proteinen war, die cAMP – Spiegel erhöhen können (Kitamura et al. 1993A).

1.7.2. Phosphatidyl-4,5-diphosphat

Einen Nachweis für die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) durch Adrenomedullin erbrachte Shimekake et al. (1995) mit seinen sehr detailierten Untersuchungen an Rinderendothelzellen der Aorta. In seinen Zellkulturversuchen konnte Shimekake et al. eine spezifische ^{125}I-ADM Bindung (EC_{50} = 10nM) und einen durch Adrenomedullin generierten Anstieg der cAMP – Spiegel beobachten (EC_{50} = 0,17nM). In diesen Endothelzellen verursachte ADM auch einen Anstieg der intrazellulären Calciumionenkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ (EC_{50} = 3nM) mit einem initialen peak, der aus der Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern resultiert, gefolgt von einem längerandauernden Anstieg, der durch eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit von Ionenkanälen in der Plasmamembran entsteht. Eine Vorbehandlung der Zellen mit U-73122, einem Inhibitor der PLC, führte dazu, dass ein Calciumionenanstieg bei Zusatz von ADM ausblieb. Zusätzlich gelang es Shimekake et al. durch Gabe von 100nM ADM einen Anstieg von IP_3 auszulösen, was für eine Beteiligung der PLC an der durch ADM ausgelösten Effekte spricht. Auch zeigen humane KG-1C Oligodendroglialzellen bei Stimulation durch ADM einen Anstieg sowohl von cAMP als auch von intrazellulären Calcium und IP_3 (Uezono et al. 1998). Kein Calciumionenanstieg in Rinderendothelzellen wurde von Barker et al. (1996) festgestellt, obwohl er einen cAMP-Anstieg fand. Ähnliches Verhalten zeigten Swiss 3T3 Zellen, eine Zelllinie, die nur spezifische ADM Rezeptoren exprimiert (cAMP↑, $[Ca^{2+}]_i$ unverändert) (Withers et al. 1996). Somit kann gesagt werden, dass die Aktivierung der PLC durch ADM nur in manchen Zelltypen eine Möglichkeit der Signaltransduktion darstellt.

1.7.3. Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK)

Die mitogen activated protein Kinasen sind in die Regulation vieler wichtiger zellulärer Prozesse wie z.B. Entzündung, Zelldifferenzierung, Zellwachstum und Zelltod involviert (Koh et al. 2000). Es wurde gezeigt, dass Adrenomedullin Wachstumsvorgänge und die Mitogenese beeinflussen kann. Bei den glomerulären Rattenmesangialzellen, die Chini et al. (1995) untersuchte, inhibierte Adrenomedullin die Proliferation (sowohl in unbehandelten als auch mit platelet derived growth factor (PDGF) stimulierten Zellen)und die MAPK-Aktivität, wobei Chini et al. (1995) einen Anstieg der Konzentrationen von cAMP und Proteinkinase A (PKA) beobachtete. Ebenfalls in Mesangialzellen konnte ADM die Endothelin-1 (ET-1) induzierte MAPK und die MAPK Kinase (Haneda et al. 1996) blockieren und die Expression einer MAPK Phosphatase stimulieren (Togowa et al. 1997). Chini et al. (1997) zeigte auch, dass ADM die PDGF stimulierte MAPK Aktivität und Mitogenese in VSMCs (Ratte) reduziert, Wirkungen die durch den PKA Antagonisten H89 aufgehoben wurden. Schließlich inhibierte ADM (cAMP$\uparrow$ wurde detektiert) in einer Rat-2 Fibroblast Zellline (exprimiert spezifische ADM Rezeptoren) die basale und PDGF induzierte MAPK (Coppock et al. 1999). Gegenteilige Befunde lieferten Versuche an glatten Gefäßmuskelzellen (Ratte), bei denen Adrenomedullin eine Erhöhung der DNA – Synthese, Zellproliferation, Tyrosinphosphorylierung, MAPK Aktivität und der Expression des immediate early Genes c-fos bewirkte (Iwasaki et al. 1998). Diese Wirkungen wurden durch $CGRP_{8-37}$ und den Tyrosinkinase-Inhibitor Genistein blockiert, aber nicht durch cAMP - und PKA-Antagonisten, was für einen cAMP unabhängigen Transduktionsweg spricht. Aus den obigen Zellkulturversuchen kann angenommen werden, dass der MAPK Transduktionsweg durch Adrenomedullin sowohl cAMP abhängig als auch cAMP unabhängig beeinflusst werden kann.

1.7.4. Weitere Adrenomedullin abhängige Transduktionswege

Die Adrenomedullinwirkung wird auch durch Kaliumkanäle vermittelt. Lang et al. (1997) zeigte in arteriellen Gehirngefäßen der Ratte, dass die ADM induzierte Vasodilatation durch Glibenclamid, einem selektiven Inhibitor der ATP – sensitiven Kaliumkanäle, oder durch Iberiotoxin, einem selektiven Inhibitor der Ca^{2+} - abhängigen Kaliumkanäle, blockiert wurde. Eine Beteiligung ATP sensitiver Kaliumkanäle an der ADM Wirkung beschrieb auch Sabates et al. (1997) und Sakai et al. (1998).

Auch Stickstoffmonoxid (NO) wird durch Adrenomedullin verstärkt gebildet (Feng et al. 1994, Hirata et al. 1995, Miura et al. 1995). Wie die Bildung von Stickstoffmonoxid durch Adrenomedullin beeinflusst wird, ist bis jetzt noch nicht vollständig geklärt. Zum einen wird vermutet, dass ADM über eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration zu einer vermehrten NO Synthese führt (Shimekake et al. 1995), zum anderen wird eine direkte Aktivierung der Stickstoffmonoxidsynthase durch Adrenomedullin via G-Proteinkopplung nicht ausgeschlossen (Shimekake et al. 1995).

1.8. Wirkungen des Adrenomedullins auf Körpergewebe

Gewebe	*Adrenomedullinwirkungen*
Gefäße	**Hypotonie, Antiproliferation, Überlebensfaktor**
Herz	**Positiv chronotrop und inotrop, Herzzeitvolumen↑, Atriales Natriuretisches Peptid (ANP) Gentranskription↑, Antimitogenese**
Lunge	**Vasodilatation, Bronchodilatation, Entzündungshemmung**
Nebenniere	**K+ und ANG II vermittelte Aldosteronsekretion↓**
Niere	**Renaler Blutfluss↑, Diurese, Natriurese, Mesangialzellproliferation↓, Reninsekretion↑**
Hypophyse	**ACTH - Secretion↓**
Gehirn	**Durstgefühl↓, Salzappetit↓, Magenentleerung↓, Sympathikusaktivierung, AVP - Sekretion↓, Kollateralisation↑, Gehirndurchblutung↑**

Tabelle 1: Den dargestellten Körpergeweben sind einzelne bisher publizierte Adrenomedullinwirkungen gegenübergestellt. Übersicht stammt aus dem Review von Samson (1998). Steigerung (↑); Abnahme (↓);

Zusammengefasst zeigen die bisherigen Veröffentlichungen, dass dem ADM zahlreiche Wirkungen zugeordnet werden können und dass verschiedene Rezeptoren mit einer Affinität für ADM existieren. Für die Bestimmung der ADM Wirkungen bzw. für die Charakterisierung der Rezeptoren mußten jedoch Adrenomedullin Konzentrationen verwendet werden, die ein Vielfaches über den physiologischen ADM Konzentrationen lagen, so dass der Schluss nahe liegt, dass ADM möglicherweise eher bei pathologischen Zuständen, in denen deutlich erhöhte ADM Proteinkonzentrationen gefunden werden, eine Rolle spielt. Zu diesen Erkrankungen zählen unter anderem Tumore, Entzündungen wie Sepsis und verschiedene Schockformen wie z.B. septischer Schock, bei dem bisher die höchsten Adrenomedullin Werte gefunden wurden. Aber wie diese starke ADM Proteinsteigerung beim septischen Schock und bei den anderen Erkrankungen induziert wird, wurde noch nicht näher untersucht. Auffallend ist jedoch, dass mit allen Erkrankungen eine nur unzureichende Versorgung mit Sauerstoff einhergeht. So gibt es bereits ***in vitro*** Befunde, die zeigen, dass zelluläre Hypoxie die ADM mRNA Expression steigern kann. Eine Untersuchung der Wirkung von Hypoxie auf die ADM Genexpression ***in vivo*** wurde bisher noch nicht durchgeführt und es soll nun im Rahmen dieser Arbeit die Wirkung von Hypoxie auf das ADM System, das auch ADM Rezeptoren beinhaltet, in verschiedenen Organen und Geweben untersucht werden.

1.9. Hypoxie und Adrenomedullin

1.9.1. ADM Genexpression unter Hypoxie

In vitro Untersuchungen an der humanen kolorektalen Karzinomzelllinie DLD-1 (Nakayama et al. 1998A), an ventrikulären Herzmuskelzellen (Cormier-Regard et al. 1998), an humanen Endothelzellen der Herzarterie (Nakayama et al. 1999B) und an humanen Glioblastomzellen (Kitamuro et al. 2000) bekräftigen die Hypothese, dass das Adrenomedullingen durch Hypoxie induziert werden kann. Nguyen et al. (1999) zeigte an HL-1 Herzmuskelzellen, dass der HIF 1 bei der Regulation des ADM Genes wichtig ist. Gararyoa et al. (2000) zeigte, dass die ADM mRNA Expression mehrerer humaner Tumorzelllinien unter Hypoxie, Deferoxamin (DFX) oder $CoCl_2$ anstieg und dass die Adrenomedullin Genexpression unter anderem vom Hypoxie induzierbarer Faktor 1α (HIF 1α) abhängig war. Der HIF 1α ist ein durch Hypoxie induzierbarer Transkriptionsfaktor, der die Expression von sauerstoffregulierten Genen

steuert. Neben diesen in vitro Daten, die auf eine mögliche Beteiligung eines verminderten Sauerstoffpartialdrucks an der Aktivierung der ADM Genexpression hindeuten, gibt es bisher nur sehr wenige Befunde, die darauf hinweisen, dass das ADM Gen möglicherweise auch in vivo durch Hypoxie induzierbar ist. So wurden bei der zyanotischen Herzkrankheit (Yoshibayashi et al. 1999) und bei der Sepsis (Hirata et al. 1996, Ehlenz et al. 1997) erhöhte ADM Konzentrationen nachgewiesen.

1.9.2. Adrenomedullinrezeptoren und Hypoxie

Über das Verhalten der Adrenomedullin Rezeptoren unter Hypoxie ist bisher sehr wenig bekannt. Qing et al. (2001) zeigte, dass in der hypoxischen Rattenlunge der CRLR und der RAMP 1 bzw. 2 bzw. 3 im Vergleich zur Normoxie anstiegen. Auch Zhao et al. (1996) konnte zeigen, dass unter Hypoxie mehr immunoreaktives Adrenomedullin an Lungengewebe gebunden wurde. Dieser Befund wies wiederum auf eine erhöhte Anzahl von Rezeptoren für ADM unter Hypoxie hin.

1.10. Zytokine und Adrenomedullin

Neben den in vitro Untersuchungen zur Wirkung von Hypoxie auf die ADM Genexpression zeigen auch verschiedene Befunde, dass die ADM Genexpression während einer Entzündung induziert wird. An entzündlichen Prozessen sind neben Endotoxinen wie LPS auch inflammatorische Zytokine beteiligt. So gilt als gesichert, dass Lipopolysaccharide (LPS) sowohl in vivo als auch in vitro das Adrenomedullingen stimulieren (Shoji et al. 1995, Zaks-Zilberman et al. 1998, Nakayama et al. 1999A, Ono et al. 2000, Samson 1999). Desweiteren gibt es Hinweise, dass auch Zytokine wie der Tumor Nekrose Faktor alpha (TNFα) und Interleukin 1beta (Il-1ß) die ADM mRNA Expression erhöhen (Sugo et al. 1994B, Nakayama et al. 1999A, Sugo et al. 1995, Lai et al. 1998) und deshalb Zytokine an der Induktion der ADM Genexpression während des Entzündungsprozesses beteiligt sein könnten. Im Teil 4.2. der vorliegenden Arbeit soll der Versuch unternommen werden, die Wirkung von inflammatorischen Zytokine auf die ADM mRNA Genexpression zu zeigen, auch unter näherer Untersuchung der intrazellulären Signalwege.

1.10.1. ADM Genexpression und Stickstoffmonoxid

Adrenomedullin führt zu einer vermehrten Synthese von NO (vgl. 1.7.4.). Desweiteren ist schon länger bekannt, dass sowohl LPS als auch Il-1ß und TNFα die iNOS aktivieren und dadurch internes NO bilden (Wong et al. 1995). Auch die ADM Genexpression wurde durch LPS und durch die proinflammatorischen Zytokine Il-1ß und TNFα induziert (vgl. 1.10.). Ebenso zeigten klinische Befunde pathophysiologischer Prozesse wie z.B. entzündlicher Erkrankungen (Ueda et al. 1999, Zhou et al. 1999) erhöhte NO- und Plasmaadrenomedullinspiegel. Dies legte die Frage nahe, ob möglicherweise NO einen Einfluss auf die ADM Genexpression hat. Dies sollte auch im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden.

1.11. Ziele dieser Arbeit

Für das erst kürzlich entdeckte Adrenomedullin wurden viele Wirkungen beschrieben, ohne dass deren physiologische Bedeutung gezeigt werden konnte. So wurde die Wirkung von Hypoxie auf die ADM Genexpression zwar schon in vitro durch Studien dokumentiert, aber ob diese in vitro Befunde auch in vivo eine Bedeutung haben, wurde bisher nur an wenigen und dazu auch noch widersprüchlichen in vivo Befunden gezeigt (Zhao et al. 1996, Wang et al. 1995). Deshalb wurde in vivo an der Sprague Dawley Ratte der Einfluss von Hypoxie auf das ADM System untersucht.
In der Niere, der Lunge, der Leber, dem Herz, dem Gehirn, den Nebennieren und in der Aorta wurde daher die ADM bzw. ADM-R mRNA Grundexpression sowie die ADM und ADM-R Genexpression, die durch die Hypoxiestimuli induziert wurde, bestimmt. Zusätzlich wurde noch in diesen Organen und Geweben sowie im Blutplasma die Konzentration an immunoreaktiven Adrenomedullin gemessen.

Lipopolysaccharide (LPS) sowie Zytokine induzieren sowohl in vitro (Sugo et al. 1995) als auch in vivo (Shoji et al. 1995) die ADM Genexpression. Dies weist auf eine wichtige Rolle des ADM während der Sepsis und bei inflammatorischen Vorgängen hin. Aber bis dato wurde noch nicht geklärt, über welche Reaktionswege die Zytokinwirkung auf das ADM Gen vermittelt wird.
Daher soll im Rahmen dieser Arbeit ein Beitrag zum Wirkungsmechanismus der Zytokine auf die ADM Genexpression geleistet werden, besonders unter Berücksichtigung des NO, über das auch Zytokine zelluläre Reaktionen beeinflussen können.

Eine Untersuchung der gemeinsamen Wirkung von Zytokinen und von Hypoxie auf die ADM Genexpression wurde als sinnvoll erachtet, da es einerseits Untersuchungen zu anderen sauerstoffregulierten Genen gab, bei denen die Hypoxie-induzierte Genexpression durch Zytokine bzw. NO in gegensätzlicher Weise beeinflusst wurde [vgl. Erythropoietin (EPO) versus Vascular endothelial growth factor (VEGF)], andererseits der septische Schock als Zustand beschrieben wurde, bei dem die hohe ADM Konzentration von physiologischer Relevanz sein könnte. Ein Kennzeichen des septischen Schocks ist die maximale Vasodilation des Gefäßsystems mit anschließender Sauerstoffminderversorgung der Gewebe.
Daher wurde auch der Einfluss von Zytokinen und Hypoxie bzw. von NO Donoren und Hypoxie auf die ADM Genexpression näher untersucht.

2. Material

2.1. Geräte

Analysenwaage	Mettler, H-20 T
Autoklav	KSG 112
Dewargefäß	Kryotechnik GmbH, Mod. Supairco
Elektrophoreseapparatur	Life Technologies Inc., Modell S2
	Pharmacia, LKB 2050 MIDGET
Geltrockner	BIO-RAD, Modell 583 gel-dryer
	Renner GmbH, Vacuum Slab gel-dryer
Heißluftschüttler	New Brunswick Scientific, Innova 4000
Inkubationsschränke	Forma ScientificInc., Dual Chamber 3319/3336
	Heraeus, Modell B 6200
	IG 150 Jouan
Instant Imager	Packard, Electronic Autoradiographie
Gefrierschränke	Siemens, Komfort plus Gefrierschrank
	New Brunswick Scientific, Ultra-low-freezer -85°C
Kühlschränke	AEG, Santo
Magnetrührer	Heidolph MR 3001
Mikroskop	Zeiss, Invertoskop ID 03
Ölpumpe	Edwards, High Vacuum Pump Typ B5/2208
PCR Geräte	MWG, Mod. Omnigene Thermocycler
	Perkin Elmer, DNA Thermocycler 480
pH-Meter	Knick, Digital pH-Meter
Pipetten	Gilson, Pipetman P10, P20, P100, P1000
Spannungsquellen	Pharmacia, LKB ECPS 3000/150
	Pharmacia, LKB GPS 200/400
	Pharmacia, Multidrive XL
	BIO-RAD, Power-Pac 3000
Sterilbank	Jouan, IC 2.12
Szintillationszähler	Packard, Tri-Carb 1500
UV-Spektrometer	Pharmacia, Gene Quant II

UV-Leuchttisch	Renner, Fluorescent Tables
Vakuumzentrifuge	Uniequex, Univapo 150H
Vortexgerät	Scientific Industries, Vortex Genie 2
Waage	Mettler, P-1210 Feinwaage
Wärmeblock	Eppendorf, Thermostat 5320
	Eppendorf, Thermomixer 5436
Wasserbad	Haake, Modell W13
Zentrifugen	Eppendorf, Centrifuge 5414, 5415, 5415C
	Heraeus, Biofuge 28 RS
	Sepatech, Megafuge 1.0
	Sorvall, Superspeed RC2-B
	Sigma, 2 K 15 Kühlzentrifuge

2.2. Verbrauchsmaterialien

Auslaufpipetten (Sarstedt) 5ml, 10ml, 25ml

Chromatographiepapier (Whatman®3mm CHR)

Deckgläser

Glaswaren (Schott)

Latexhandschuhe (Roth, Romed, Hartmann)

Multiwell Platten (Roth) 96er, 24er

Objektträger

Petrischalen (steril)

Pipettenspitzen (Sarstedt)

Polypropylenzentrifugenröhrchen

Reaktionsgefäße (Sarstedt) 0,5ml, 1,5ml, 2,0ml

Röntgenfilme (Kodak, Biomax MR; Konika, X-Ray Film medical)

Schraubgefäße (Sarstedt) 15ml, 50ml

Skalpellklingen (steril)

Zellkulturflaschen (Sarstedt) 25cm² und 75cm² (vented)

2.3. Chemikalien

Acrylamid (USB)
Agarose (Biozym)
Ammoniumpersulfat (Sigma)
Borsäure (Merck)
Bromphenolblau (Sigma)
Chloroform (Merck)
Diethylpyrocarbonat DEPC (Fluka)
Dithiothreitol DTT (Gibco)
Essigsäure (Merck)
Ethanol p.a. (Merck)
Ethidiumbromid (Sigma)
Ethylendiamintetraessigsäure EDTA (Sigma)
Formamid (Fluka)
Glycerin 87% (Merck)
Guanidinium Thiocyanat (Fluka)
Harnstoff (Merck)
8-Hydroxychinolin (Sigma)
Isopropanol (Merck)
Kollagenase A (Boehringer)
ß-Mercaptoethanol (Merck)
Methanol (Merck)
Natriumacetat (Merck)
Natriumchlorid (Merck)
Natriumcitrat (Merck)
Natriumdodecylsulfat SDS (Serva)
Natriumhydrogencarbonat (Merck)
Natriumhydroxid (Merck)
Phenol (Merck)
Photochemikalien (Entwickler G230, Fixierer G305, Agfa)
Piperazine-N,N´-bis[2-ethane sulfonic acid] PIPES (Sigma)
Repellsilan (Pharmacia)
N-Laurylsarcosin Natriumsalz (Fluka)

Szintillationsflüssigkeit (Roth, Rotiszint-22®)

Tetramethylethylendiamid TEMED (Sigma)

Tris (Fluka)

Tris-aminomethan (Sigma)

Tris-ammoniummethan (Merck)

2.4. Enzyme

M-MLV Reverse Transkriptase, 200 U/µl (Gibco)

Taq Polymerase, 5.000 U/ml (Boehringer)

BamH1, 18.000 U/ml (Pharmacia)

DNase I, 7500 U/ml (Pharmacia)

EcoRI, 20.000 U/ml (Pharmacia)

EcoRV, 15.000 U/ml (Pharmacia)

Hind III, 18.000 U/ml (Pharmacia)

T4- Ligase, 6.000 U/ml (Pharmacia)

SP6-Polymerase, 80.000 U/ml (Promega)

2.5. Vektoren

pCR®-II-TOPO

2.6. Lösungen

2.6.1. Zellkulturmedien

2.6.1.1. A7r5 AorticVascularSmoothMuscleCells (AVSMC)

Dulbecco´s modified Eagle Medium DMEM (Biochrom); 500ml	5ml Antibiotikakonzentrat (10000U/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycinsulfat (Pen/Strep)) (Biochrom) 50ml Fetales Kälberserum (Biochrom) 10ml L-Glutamin (Biochrom) 5ml Natriumpyruvat (Biochrom) ad 500ml DMEM Fertigmedium (Biochrom)

2.6.1.2. Primärkulturen von glomerulären Mesangialzellen; glomeruläre Endothelzellen

RPMI 1640 Medium; 1000ml	2,2g Natriumhydrogencarbonat 10,42g RPMI 1640 Trockenmedium (Biochrom) 10ml Antibiotikakonzentrat (Pen/Strep) 100ml Fetales Kälberserum (Biochrom) 1ml Insulin (660U/ml) (Sigma) ad 1000ml steriles H_2O_{bidest}

2.6.1.3. Primärkulturen von Hepatozyten

Minimal Earle Medium MEM; 1000ml	9,83g MEM Trockenmedium (Biochrom) 10ml Antibiotikakonzentrat (Pen/Strep) 100ml Fetales Kälberserum (Biochrom) 1ml Hydrocortison (2mg/ml in DMSO) 1ml Insulin (660U/ml) ad 1000ml steriles H_2O_{bidest}

2.6.2. Isolierung von Total RNA

Lösung D (500ml)	250g Guanidinium Thiocyanat 293ml H_20_{bidest} 125ml 0,1M Natriumcitrat 26,4ml 10% Sarcosyl 360µl ß-Mercaptoethanol / 50ml Lösung D (vor Gebrauch zugeben; Stabilität: 1 Monat)
Phenol (wassergesättigt)	1kg geschmolzenes Phenol 1Vol. DEPC-Wasser 0,1% Hydroxychinolin schütteln, Phasentrennung abwarten
Natriumacetat (2M, pH4)	41,02g Natriumacetat 120ml Eisessig (pH4 einstellen) ad 250 ml DEPC-Wasser
Ethanol 70%(V/V)	7Teile Ethanol p.a. 3Teile DEPC-Wasser
Natriumcitrat (0,1M, pH7)	7,35g Natriumcitrat pH7 mit HCl (1M) einstellen ad 250ml DEPC-Wasser

2.6.3. RT/PCR und Klonierung

2.6.3.1. Puffer und Lösungen

10x PCR Puffer (Boehringer)	100mM Tris/HCl (pH8,3) 100mM KCl 15mM $MgCl_2$
10x Ligationspuffer	200mM Tris/HCl (pH7,6) 50mM $MgCl_2$ 50mM DTT 50µg/ml BSA 1mM Adenosintriphosphat ATP
10x One for all Buffer (Promega)	100mM Tris-Acetat 100mM Mg-Acetat 500mM K-Acetat

5x RT Puffer(Gibco)	0,25mM Tris/HCl (pH8,3) 0,375M KCl 50mM DTT 15mM $MgCl_2$
10x Kinase Puffer	0,5M Tris/HCl (pH7,6) 0,1M $MgCl_2$ 50mM DTT 1mM EDTA (pH8)
10x TBE Puffer	0,9M Tris Base 0,9M Borsäure 0,02M EDTA
Auftragspuffer	0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol 50% Glycerol ad 100ml H_2O
DNA Molekulargewichtsstandard	λDNA/Pvu II Fragmente φX 174 RF DNA/Hae III Fragmente(Gibco) pbR 322/Hpa II (Promega)
Ethidiumbromidlösung	Ethidiumbromid 50mg/ml in H_20

2.6.3.2. Agarplatten und LB Medien

LB-Agarplatten	1% Bactotrypton (Difco) 0,5% Bactoyeast (Difco) 1% NaCl 3% Bactoagar (Difco) in H_2O_{bidest} lösen, autoklavieren + Antibiotikum (80µg/ml) in Petrischalen mit Deckel (Falcon) gießen
LB-Agarplatten (blau/weiß)	1% Bactotrypton (Difco) 0,5%Bactoyeast (Difco) 1% NaCl 3% Bactoagar (Difco) in H_2O_{bidest} lösen, autoklavieren + Antibiotikum (80µg/ml) + 0,08% 100mM IPTG (Gerbu) + 0,2% X-Gal 25 in DMF (Sigma) in Petrischalen mit Deckel (Falcon) gießen

LB-Medium	1% Bactotrypton (Difco) 0,5%Bactoyeast (Difco) 1% NaCl in H_2O_{bidest} lösen, autoklavieren

2.6.4. In vitro Transkription

TE-Puffer	2M Tris HCl (pH7,5) 0,5M EDTA (pH8)
TE-Puffer/0,1% SDS (TES)	TE-Puffer + 0,1% SDS

2.6.5. RNase Protection Assay

Hybridisierungspuffer (pH6,4)	40mM PIPES 400mM NaCl 80% Formamid 500mM EDTA
RNase Puffer	10mM Tris (pH7,5) 5mM EDTA 300mM NaCl
RNase-Stammlösung	4mg/ml RNase A (Boehringer) 200µg/ml RNase T1 (Boehringer) in RNase Puffer
Proteinase K/ SDS Lösung	1mg Proteinase K in 1ml RNase Puffer vor Gebrauch: + 200µl 20% SDS Lösung
Phenol/Chloroform Lösung	1Vol Aquaphenol (Appligene)(pH8 mit 1M Tris HCl) 1Vol Chloroform p.a. + 0,1% Hydroxychinolin
DEPC-Wasser	1ml Diethylpyrocarbonat (Fluka) ad 1l H_2O_{bidest}; autoklavieren
Auftragspuffer für Acrylamidgele	0,1% Bromphenolblau (Merck) 0,1% Xylencyanol (Merck) 80% Formamid in 1x TBE Puffer
10% APS	5g APS ad 50ml H_2O

8% Acrylamid	Rotiphorese®Sequenziergelsystem (Roth) 3,2Vol Konzentrat 5,8Vol Verdünner 1Vol Puffer

2.6.6. Kommerzielle analytische Kits

ADM (Rat) Radio Immuno Assay Kit (Phoenix Pharmaceuticals)

QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen)

Plasmid Maxi Kit (Qiagen)

TOPO®II PCR Cloning KIT (Invitrogen)

TOPO®TA Cloning Kit (Invitrogen)

3. Methoden

3.1. In vivo Experimente

3.1.1. Tiere

Für die in vivo Versuche wurden männliche Sprague Dawley Ratten , deren Gewicht 220 – 240g betrug, verwendet. Alle Tiere hatten bei den Experimenten freien Zugang zu Wasser und Futter. Als Standardfutter wurden Altromin® Pellets für Ratten und Mäuse verwendet.

3.1.2. Stimulation der Ratten mit anschließender Organentnahme

Männliche Sprague Dawley Ratten wurden für 6 Stunden in Plexiglaskammern den folgenden Bedingungen ausgesetzt:

A) Normale Atemluft durchströmt die Kammer (Konrolle).

B) Ein Gasgemisch bestehend aus 92% Stickstoff (N_2) und 8% Sauerstoff (O_2) durchströmt die Kammer (Hypoxie 8%O_2)

C) Ein Gasgemisch bestehend aus Atemluft und 0,1% Kohlenmonoxid (CO) durchströmt die Kammer (0,1%CO).

D) Die Tiere erhalten eine subcutane Injektion von 60mg/kg Kobalt-II-chlorid ($CoCl_2$) und die Kammer wird anschließend von Atemluft für die jeweils angegebenen Zeiträume durchströmt.

Nach Ablauf der Versuchsdauer wurden die Tiere dekapitiert, das Blut wurde in Röhrchen (enthielten EDTA) gesammelt und dem Tier wurden die folgenden Organe bzw. Körpergewebe entnommen:

-Nieren, wobei eine der beiden Nieren in Nierenrinde (-kortex), äußeres Nierenmark (- outer medulla) und inneres Nierenmark (- inner medulla) aufgeteilt wurde

-Nebennieren

-Herz

-Lunge

-Leber

-Gehirn

-Aorta

Die Organe und die Aorten wurden nach der Entnahme in flüssigen Stickstoff gegeben und bei –80°C bis zur Isolierung der Total RNA aufbewahrt. Das Blut wurde abzentrifugiert und das erhaltene Blutserum (stabilisiert mit EDTA) wurde bei –20°C aufbewahrt.

3.2. In vitro Experimente

3.2.1. Die Zelllinie A7r5 AVSMC

Die glatte Gefäßmuskelzelllinie aus der Aorta von BDXI Ratten (A7r5 AVSMC) (ATCC CRL 1444) wurde in Dulbecco´s Minimal Earle Medium (D-MEM) (Biochrom) unter Zusatz von 20ml/L Glutamin (200mM) (Biochrom), 10ml/L Natrium Pyruvat (100mM) (Biochrom), 10ml/L Penicillin (10000U/ml)/Streptomycin (10000µg/ml) und von 10% fetalem Kälberserum (FKS) (Biochrom) in 75cm² Flaschen (Sarstedt) kultiviert. Die A7r5 AVSMC wurden in einem Inkubator (Heraeus) mit einem Gasgemisch bestehend aus Raumluft und 10% CO_2 bei 37°C inkubiert. Nach 2-3 Tagen wurde das Medium gewechselt. Die Zelllinie A7r5 AVSMC war nach einer 7-10 tägigen Wachstumsphase konfluent (mikroskopische Kontrolle) und wurde entweder für die Versuche verwendet, wobei das Medium 8 - 12h vor Versuchsbeginn gewechselt wurde, oder wurde erneut 1:5 gesplittet. Das Zellensplitten erfolgte mit Trypsin/EDTA bei 37°C für 5 min.

3.2.2. Gewinnung und Kultivierung von Primärkulturen von Rattenmesangialzellen

Für die Präparation der Rattenmesangialzellen wurden männliche Sprague Dawley Ratten mit einem Gewicht von 90-120g verwendet und die primären Mesangialzellen nach folgender Methode von Kurtz et al. (1983) gewonnen:
Die Ratten wurden mittels Kohlendioxid getötet, der Bauchraum wurde eröffnet, die beiden Nieren wurden unter aseptischen Bedingungen entnommen und kurzfristig in einer sterilen isotonen Lösung [Lösung. A] (KCl (5mM), $CaCl_2$ (2mM), NaCl (130mM), Glucose (10mM), Saccharose (20mM), Tris (10mM), (pH 7,4 mit 38% HCl einstellen)) aufbewahrt. Alle nachfolgenden Schritte wurden in einer Sterilbank (Laminar Airflow; Fa. Jouan) durchgeführt. Nachdem die Nierenkapseln mit Hilfe eines sterilen Skalpells entfernt wurden, wurden die Nieren auf ein steriles 100µm Netz gegeben und durch das 100µm Netz

hindurchgedrückt. Das so zerkleinerte Nierengewebe wurde mit steriler Lösung A versetzt und die entstandene Suspension wurde über eine Kombination aus 150µm und 50µm Netzen gespült und dadurch von gröberen Bestandteilen befreit. Die Glomeruli sammelten sich im 50µm Netz, wurden in ein steriles Becherglas überführt und in einem 50ml Falcon Tube (Sarstedt) bei 2200rpm (Heraeus, Biofuge 28S) für 7min abzentrifugiert. Nach 10 min Kollagenaseverdau [Kollagenase A (Boehringer Mannheim) 0,3U Aktivität] wurde wiederum bei 2200rpm für 7min abzentrifugiert. Das nun erhaltene Pellet wurde in RPMI 1640 Medium (Biochrom) resuspendiert und die Glomeruli wurden in 75 cm² Flaschen [60-80 Glomeruli pro cm²] pipettiert. Die Kultivierung der Glomeruli erfolgte in 15ml RPMI 1640 Medium, dem 660U/L Insulin (Sigma) und 10ml/L Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurden, bei 37°C und unter 95% Raumluft und 5% CO_2. Das Medium wurde zum ersten Mal nach 5 Tagen gewechselt und danach alle 2-3 Tage. Nach 5-6 Wochen waren die Mesangialzellen konfluent und wurden für die Versuche verwendet.

3.2.3. Präparation von Primärkulturen von Rattenhepatozyten

Diese Präparationsmethode ist ebenfalls am Lehrstuhl Kurtz etabliert (Eckardt et al. 1994) und soll kurz vorgestellt werden:

Ausgangsmaterial für die Hepatozyten war die Leber einer 70-80g schweren männlichen Sprague Dawley Ratte. Nach Betäuben der Ratte mit einem Anästhetikum (Trapanal; 100mg/kg Tier) wurde der Bauchraum eröffnet, die Pfortader kanüliert und diese so schnell wie möglich mit 10ml steriler Heparinlösung (1000U/ml) gefolgt von einer sterilen Lösung L1 (HBSS (1x; 48ml) + HEPES (50x; 1ml) + EGTA (25mM; 1ml)) für 5min durchspült. Die Verdauung der Leber erfolgte mit einer Kollagenase A (Aktivität: 0,3U) enthaltenden Lösung L2 (HBSS (1x; 48ml) + $CaCl_2$ (0,5 M; 1ml) + HEPES (50x; 1ml) + 150µl 1N NaOH) für 8-10 min. Nach vollständigem Verdau wurde die Leberkapsel eröffnet, die Hepatozyten wurden in Hanks Balanced Salt Solution (HBSS; 1x) suspendiert, mit Hilfe eines 50µm Netzes von gröberen Bestandteilen gereinigt und in ein steriles Becherglas gespült. Eventuelle Kollagenaserückstände wurden durch dreimaliges Waschen und Abzentrifugieren bei 2200rpm (Heraeus Biofuge 28RS) für 7 min entfernt. Die gereinigten Hepatozyten wurden so auf 75 cm² Flaschen verteilt, dass sie den Flaschenboden vollständig bedeckten. Als Medium wurde Minimal Earle Medium (Biochrom) verwendet. Diesem wurden 1mg/L Hydrocortison,

660 U/L Insulin und 10ml/L Penicillin/Streptomycin zugesetzt. Nach 12 Stunden Inkubation wurde mit den Versuchen begonnen.

3.2.4. Die Kultivierung der glomerulären Endothelzelllinie

Die glomerulären Endothelzellen (EZ´s) von Sprague Dawley Ratten wurden von der DSMZ (Braunschweig, Deutschland – Referenz: ACC 262) bezogen. Für die Zellkultur wurden die gleichen Inkubations- und Mediumbedingungen wie für die Mesangialzellen verwendet. Aufgrund des schnellen Wachstums der EZ´s wurde das Medium am zweiten Tag nach dem Splitten gewechselt und die Zellen waren am dritten Tag konfluent.

3.3. Isolierung von Total RNA

3.3.1. Isolierung von Total RNA aus Organen

Die Total RNA aus Niere, Nierenzonen, Nebennieren, Herz, Lunge, Leber, Gehirn und Aorta wurde nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) isoliert. Alle Arbeiten wurden auf Eis ausgeführt, zum Schutz vor RNase-Kontamination wurden Latexhandschuhe getragen und alle Geräte und Lösungen waren RNase-frei. Als erstes wurden die Organe mit einem Ultra Turrax Mixer in der für jedes Organ notwendigen Lösung D (1ml Lösung D pro 100mg Gewebe) (4M Guanidin-thiocyanat; 0,5% Natriumlaurylsarcosinat; 10mM EDTA;25mM Natriumcitrat; 700mM ß-Mercaptoethanol) homogenisiert. Das erhaltene Homogenat wurde pro ml Lösung D nacheinander mit 100µl 2mM Natriumacetat (pH 4), 1ml wassergesättigtes Phenol und 200µl Chloroform versetzt, wobei nach jeder Reagenzienzugabe für 10sec gevortext wurde. Nach 15min auf Eis und anschließender Zentrifugation (4°C/10.000g/20min) wurde der Überstand in ein neues Polypropylenröhrchen pipettiert, mit gleichem Volumen Isopropanol versetzt und die erhaltene Lösung nach einer Stunde Abkühlung auf - 20°C wiederum abzentrifugiert (4°C/10000g/20min). Das erhaltene Pellet wurde in 500 µl Lösung D resuspendiert, mit 50µl 2mM Natriumacetat (pH 4) angesäuert und mit 1,25ml $Ethanol_{absolut}$ ausgefällt.

Nach erneuter Abkühlung auf -20°C (min. 1h) wurde erneut abzentrifugiert (4°C/10000g/20min), das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in DEPC Wasser gelöst und bei -80°C aufbewahrt.

3.3.2. Isolierung von Total RNA aus Zellen

Die Isolierung aus Zellen wurde ebenfalls nach der Methode von Chomczynski und Sacchi durchgeführt, wobei eine geringe Modifikation erfolgte. Da Zellen weniger und reineres Ausgangsmaterial bieten, wurde die nochmalige Resuspendierung mit 500µl Lösung D mit anschließender Fällung nicht durchgeführt. Ansonsten verlief die RNA Isolierung wie unter 3.3.1..

3.3.3. Quantifizierung und Reinheit der isolierten RNA

Die in DEPC Wasser gelöste RNA wurde bei 260nm und 280nm photometrisch vermessen. Die RNA Menge wird durch den Wert bei 260 nm quantifiziert. Für die RNA Qualität kann der Quotient aus den Werten bei 260nm und 280nm gebildet werden. Je näher der Quotient (Wert bei 260nm/Wert bei 280nm) sich dem Wert 2.0 nähert, umso geringer sind die Verunreinigungen mit Proteinen. Typische Werte für den Quotienten lagen im Bereich von 1,4 –1,8.

3.3.4. Qualitätskontrolle der RNA

Die Qualität der isolierten RNA kann durch Bestimmung der 18S und 28S RNA mit Hilfe der Gelelektrophorese überprüft werden. Das Auftreten von klaren, nicht schmierenden Banden gilt als Zeichen für intakte RNA.
Für die Überprüfung der RNA Qualität wurde 1µg isolierte Total RNA mit DEPC Wasser auf 20µl aufgefühlt und mit 2,2µl RNase-freiem Ladepuffer versetzt. Nach 5 minütiger Denaturierung (95°C) wurde die RNA auf ein 1%iges Agarosegel [enthielt 2µl Ethidiumbromid (50mg/ml)] aufgetragen und bei einer Spannung von 120 Volt aufgetrennt. Bei der Durchführung der Gelelektrophorese war darauf zu achten, dass alle verwendeten

Lösungen, Gele und sonstige Materialien RNase-frei waren, um eine eventuelle Kontamination mit RNasen und somit falsche Befunde durch den nachfolgenden RNA Abbau zu vermeiden.

Alle für diese Arbeit verwendeten RNA Proben wurden dieser Qualitätsprüfung unterzogen. Die Abbildung 5 zeigt die 18S und 28S RNA acht verschiedener RNA Präparationen von A7r5 AVSMC.

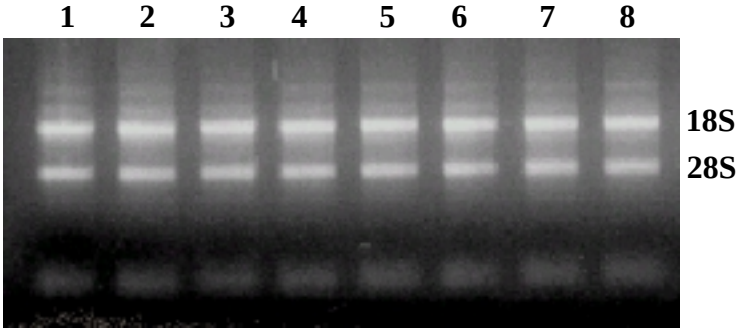

Abb. 5: RNA Präparation von A7r5 AVSMC auf ein Agarosegel 1,2% aufgetragen. Die Spuren 1 – 8 stellen je 1µg Total RNA dar.

3.4. Quantifizierung der mRNA mit dem RNase Protection Assay

Kurze Beschreibung des Prinzips:

Der RNase Protection Assay verwendet eine komplementäre radioaktiv markierte RNA (cRNA), die mit der mRNA eines gesuchten Genes stabile Hybride bildet. Hierzu wurde die gesamte mRNA der betreffenden Spezies in DNA umgeschrieben (RT-Reaktion mit dem Enzym Reverse Transkriptase). Mit dem so entstandenen DNA – Pool und spezifisch ausgewählten Oligonucletiden wurde in der Polymerase Kettenreaktion (PCR) die cDNA des gewünschten Genes amplifiziert. Dieses DNA – Fragment wurde durch Ligation in einen Vektor kloniert und die Basensequenz der cDNA (Insert) sequenziert. Eine „In vitro Transkription“ mit α^{32}P Guanosintriphosphat ([α^{32}P]-GTP) erzeugte die für die Hybridisierung notwendige radioaktiv markierte cRNA-Sonde, die zur Total RNA gegeben wurde. Es entstanden stabile Hybride, die nach verschiedenen Verdau- und Reinigungsschritten mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und aufgrund der Radioaktivität der cRNA quantifiziert wurden.

3.4.1. Herstellung der cDNA Fragmente durch RT- und PCR-Reaktion

3.4.1.1. Verwendete cDNA Plasmide

Die Plasmide zur Herstellung α^{32}P markierter Sonden für die ADM-, ß-Aktin-, EPO- und iNOS mRNA wurden bereits für frühere Arbeiten am Lehrstuhl für Physiologie I, Prof. Kurtz [Universität Regensburg] verwendet und mir freundlicherweise von Frau Dr. Wagner und den Herren Dr. Sandner und Dr. Wolf zur Verfügung gestellt. Die Tabelle 2 zeigt die für die Plasmidklonierung und α^{32}P – Markierung notwendigen Daten.

Gen	5´Primer	3´Primer	Klonierungs-vektor	Geschützte Fragmentlänge	Linearisierung	Literatur für die Primer
Adrenomedullin (ADM)	5´CGGGATCC TTATTGGGTT CGCTCGC3´	5´GGAATTCG CCATAGCCTT GAGGGCT3´	**pSP73**	**410 bp**	**HindIII**	Sakata et al. 1993
Adrenomedullin-rezeptor (ADM-R)	5´CGGGATCC ATGGCTGGA GGTCATGCT3´	5´GGAATTCG ATATGTACC ACCTCAG3´	**pCR-II-TOPO®**	**319 bp**	**Eco RV**	Genbank S79811 (ACC)
ß-Aktin	5´ÁCCAACTG GGACGACAT G3´	5´ATGCTCTC CCTCACGCC G3´	**pSP73**	**293 bp**	**Bam H1**	Alonso et al. 1986
Erythropoietin (EPO)	5´GGAATTTG CAGACCTCCC CCGTGTA3´	5´GAATTCCTC TGGGCCCTCC CAGTCC3´	**PSP64**	**132 bp**	**Eco RI**	Ratcliffe et al. 1990
NO-Synthase II (iNOS)	5´GCAGCTGT GCTCCATAGT 3´	5´GATAGGACG TAGTTCAACA T3´	**pGEM® 3Z**	**418 bp**	**Eco RI**	Gen EMBL ACLI2562

Tabelle 2: Aufstellung der verwendeten cDNA Plasmide zur Sondenherstellung

3.4.1.2. Klonierung des ADM-R Plasmids

Die Durchführung der Klonierung und Markierung von Plasmiden soll anhand des ADM-R Plasmids näher erläutert werden.

3.4.1.2.1. Reverse Transkriptase (RT) Reaktion

Die RT-Reaktion schreibt einen vorliegenden mRNA-Pool mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in den korrespondierenden DNA – Pool um. Für die RT-Reaktion wurden 500ng Total RNA im folgenden Reaktionsansatz umgesetzt, wobei oligo dT Stücke, die am Poly A Ende der mRNA binden, als Primer für die Reaktion verwendet wurden.

500ng Total RNA
0,5µl oligo dT (1µg/µl)
ad 10µl H2O/DEPC
5min/65°C
zu diesem Ansatz wurden folgende Reagenzien pipettiert:
4µl dNTP (2,5mM)
4µl 5x „first strand puffer“
0,5µl BSA (2µg/µl)
0,5µl RNasin (40 U/µl)
2µl DTT (100mmol)
1µl Reverse Transkriptase (200 U/µl)
1h/37°C
1min/95°C
Der RT Ansatz hatte ein Gesamtvolumen von 22µl, von denen 3µl für die sich anschließende PCR Reaktion eingesetzt wurden.

3.4.1.2.2. Polymerase Kettenreaktion

Die PCR ist die Methode, um bestimmte Nukleotidsäuresequenzen zu vervielfältigen. Dazu werden Oligonucleotide, die an die gesuchte DNA selektiv binden, so ausgewählt, dass der 5´Primer (Sense Primer), der mit der sense DNA identisch ist, am 5`Ende eine Restriktionsenzymschnittstelle erhält und der 3´Primer (antisense Primer), der komplementär zur sense DNA ist, ebenfalls am 5´Ende eine Restriktionsenzymschnittstelle erhält. Diese Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Für die PCR werden sowohl der 5´Primer, als auch der 3´Primer benötigt. Im folgenden ist der Reaktionsansatz dargestellt:

3µl cDNA (aus der RT)
2µl 10xPuffer (mit 1,5mM Mg^{2+})
2µl dNTP (2,5mM)
1µl 5´Primer (20pmol)
1µl 3´Primer (20 pmol)
ad 19µl H_2O
Überschichten des Reaktionsansatzes mit 1Tropfen Mineralöl (Sigma)
5min/95°C
5min/65°C

Während der 5min/65°C wurde zum Reaktionsansatz 1µl Taq Polymerase (1U/µl) zugegeben und die PCR gestartet. Ein Zyklus begann mit dem Erhitzen des Reaktionsanatzes auf 95°C für 1min (Denaturieren der doppelsträngigen DNA), danach folgte die für die Primerkombination ideale Annealingtemperatur 60°C für 1min und als Zyklusabschluß wurde auf 72°C für 1 min zur Synthese der DNA bzw. cDNA (Extension) erhitzt. Die Zyklenanzahl betrug für die ADM-R DNA 34. Am Ende der PCR wurde für 10 min auf 72°C erhitzt, um noch unvollständige DNA Fragmente fertig zu stellen.
Die PCR für das Genfragment des ß-Aktins diente zur Kontrolle der Qualität der eingesetzten DNA. Für die ß-Aktin Kontroll-PCR wurde eine 1:1000 Verdünnung der DNA (aus der RT-Reaktion) verwendet, um diese PCR ebenfalls mit 34 Zyklen durchführen zu können.

3.4.1.2.3. Kontrolle der PCR Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient zur Auftrennung von PCR Fragmenten nach deren Länge und ist gleichzeitig eine Möglichkeit, die Ausbeute an DNA zu bestimmen. Dazu wurde ein 2%iges Agarosegel (2g Agarose ad 100ml 1x TBE Puffer + 2µl Ethidiumbromidlösung) hergestellt und die mit Ladepuffer versetzten PCR Produkte (18µl PCR Produkt + 2µl Ladepuffer (10x)) wurden im Agarosegel elektrophoretisch bei 120 V horizontal aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1xTBE Puffer verwendet.

3.4.1.3. Herstellung des ADM-R Klons

3.4.1.3.1. Ligation des ADM-R Fragments in den pCR®-II-TOPO Vektor

Die ADM-R Fragmente aus der PCR (3.4.1.2.2.) haben durch die Taq-Polymerase an ihren beiden 3`Enden überhängende Adeninbasen. Der pCR®-II-TOPO Vektor ist ein TA-Klonierungsvektor, der durch die Topoisomerase I aktiviert ist. Daher wurde für die Ligation folgender Reaktionsansatz verwendet:

4µl ADM-R PCR-Fragment (aus 3.4.1.2.2.)
1µl pCR®-II-TOPO Vektor

Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Ligationsreaktion wurde durch Zugabe von 1µl 6x TOPO® Cloning Stop Solution unterbrochen, der Ansatz wurde kurz abzentrifugiert, auf Eis gelagert und direkt für die Transformationsreaktion verwendet.

6x TOPO® Cloning Stop Solution:	0,3 M NaCl
	0,06 M $MgCl_2$

3.4.1.3.2. Transformation des ADM-R Plasmids in kompetente Bakterienzellen

Als kompetente Bakterienzellen wurden die im One Shot Kit (Invitrogen) enthaltenen chemisch kompetenten E. coli verwendet. Zu den auf Eis aufgetauten 50µl kompetenten E. coli wurden 3µl des Ligationsansatzes (3.4.1.3.1.) pipettiert. Nach 30min auf Eis wurde der Ansatz für 1min auf 42°C erwärmt, wiederum für 2min auf Eis inkubiert und nach Zugabe von 250µl Ampicillin-freiem SOC-Medium wurde für 1h bei 37°C bei 200 rpm im Heißluftschüttler inkubiert. Von den so behandelten E. coli, wurden 150µl Reaktionsansatz auf vorgewärmte LB Platten mit Ampicillin (80µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Auf die LB Platten wurden zuvor 40µl X-Gal Stammlösung ((20mg/ml) in DMF) aufgebracht. X-Gal wird vom Enzym ß-Galactosidase zu dem blauen Farbstoff 5-Brom-4-Chlor-Indigo umgesetzt. Die ß-Galactosidase ist als Basensequenz im pCR®-II-TOPO Vektor enthalten und wurde nur dann synthetisiert, wenn der pCR®-II-TOPO

kein Insert aufgenommen hatte (Bildung einer blauen Kolonie). Wurde hingegen ein Insert aufgenommen, so wurde die ß-Galactosidase Gensequenz unterbrochen und es bildete sich eine weiße Kolonie, die für die anschließende Mini Prep gepickt wurde.

SOC-Medium	2% Trypton
	0,5% Yeast Extrakt
	10mM NaCl
	2,5mM KCl
	10mM $MgCl_2$
	10mM $MgSO_4$
	20mM Glucose

3.4.1.3.3. Vermehrung der Klone

Nach 16-20 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die LB Platten auf E. coli Klone überprüft, die nur dann entstanden waren, wenn die entsprechenden E. coli einen Vektor mit (weiße Kolonie) oder ohne Insert (blaue Kolonie) aufgenommen hatten, denn nur dann hatten die Bakterien die zum Überleben notwendige Ampicillinresistenz. Das Animpfen erfolgte in der Weise, dass pro LB Kultur mit einem sterilen Zahnstocher ein weißer Klon gepickt und in 5ml LB Medium mit 80µg/ml Ampicillin gegeben wurde. Dann wurden die angeimpften LB Kulturen im Schüttler bei 37°C für 16-20h inkubiert. In der darauffolgenden Mini Prep (3.4.1.3.4.) bzw. Maxi Prep (3.4.1.3.5.) wurden die Plasmide isoliert und durch EcoRI Restriktionsverdau (3.4.1.3.6.) wurde festgestellt, ob ein Insert im Vektor vorhanden war.

3.4.1.3.4. Isolierung von Plasmiden aus Bakterien im kleinen Maßstab („Mini Prep“)

Die Mini Prep ist die Methode, um innerhalb kurzer Zeit genügend Plasmid DNA in der erforderlichen Menge und Reinheit für die Basensequenzanalyse zu erhalten.

Vorgehen:
Den unter 3.4.1.3.3. angesetzten LB Kulturen wurden nach 16-20h Inkubation 2ml entnommen, in ein 2ml Eppendorf-Cup überführt, bei 10000g für 30sec pelletiert und mit

Hilfe von Reagenzlösungen eines kommerziellen Isolationskits der Fa. Qiagen isoliert. Die erhaltenen Pellets wurden mit je 150µl des P1 Puffers (enthält RNase A) versetzt und unter Vortexen resuspendiert. Vom Puffer P2 wurden ebenfalls 150µl auf die Suspension pipettiert, die Inhalte wurden sehr vorsichtig durchmischt und nach 5min Bakterienlyse wurden 150µl des eiskalten Puffers P3 hinzugegeben. Nach wiederum vorsichtiger Durchmischung wurde für 20min auf Eis inkubiert, anschließend 15min bei 10000g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Cup (enthielt 400µl Isopropanol) überführt. Nach erneuter Zentrifugation für 15min bei 10000g und 4°C wurde das erhaltene DNA Pellet mit eiskalten 70%igem Ethanol versetzt und wiederum für 15min bei 10000g und 4°C abzentrifugiert. Nachdem das Pellet in der Vakuumzentrifuge getrocknet wurde, wurde es in 30µl destilliertem Wasser gelöst. Nun konnte durch einen Kontrollverdau festgestellt werden, ob im Vektor ein Insert enthalten war.

3.4.1.3.5. Isolierung von Plasmiden aus Bakterien im großen Maßstab („Maxi Prep“)

Die Mini Prep dient zur Gewinnung einer geringen Plasmid DNA Menge, die jedoch für die Überprüfung auf das Vorhandensein eines Inserts wie auch zur Basensequenzanalyse völlig ausreichend ist. Für den Protection Assay wird aber Plasmid DNA in höherer Reinheit und in größerer Menge benötigt. Daher wurden Plasmide in größerem Maßstab wie bei der Mini Prep mit dem Isolationskit der Fa. Qiagen gewonnen, wobei bei der Maxi Prep noch zusätzliche Reinigungsschritte hinzukamen.

Vorgehen:
Wie bei der Mini Prep wird auch bei der Maxi Prep eine ÜN Kultur benötigt, bei der 200 – 300ml LB Medium entweder mit 100µl der Miniprep (3.4.1.3.4.) oder mit der Glycerinkultur (3.4.1.3.7.) angeimpft und dann über Nacht bei 37°C geschüttelt wurden. Die Bakterien wurden am nächsten Tag bei 3500rpm 15min abzentrifugiert (Heraeus Biofuge RS28). Das erhaltene Bakterienpellet wurde bei der Maxi Prep in 10ml Puffer P1 resuspendiert, anschließend mit 10ml Puffer P2 versetzt, vorsichtig durchmischt und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 10ml Puffer P3 hinzugefügt, das entstandene Lösungsgemisch wurde in ein Polycarbonatröhrchen (dessen Inhalt kann auch mit über 20000g abzentrifugiert werden) überführt, wiederum vorsichtig durchmischt und für 20min auf Eis inkubiert. Die Zentrifugation erfolgte bei 20000g für 30min. Der erhaltene Überstand

wurde erneut in ein Polycarbonatröhrchen überführt und dann wiederum abzentrifugiert oder wurde über ein Filter gegeben, um noch eventuell vorhandene Schwebeteilchen zu entfernen. Nun wurde die so aufgereinigte Lösung auf die im Kit enthaltenen Qiagen 500 Maxi Tips, die vorher mit QBT äquilibriert wurden, gegeben und die Plasmid DNA wurde an die Säule der Qiagen 500 Maxi Tips gebunden. Nach dem 2 fachen Waschen der Säule mit je 30ml Puffer QC (Entfernung von Salzen), wurde die an die Säule gebundene Plasmid DNA mit 15ml Puffer QF eluiert und mit 0,7 Volumenanteilen Isopropanol ausgefällt. Durch anschließende Zentrifugation wurde die DNA pelletiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen, erneut pelletiert, getrocknet und in 100 – 500µl H_2O_{bidest} (je nach Pelletgröße) gelöst. Eine photometrische Messung gab Aufschluß über die gewonnene Menge und Reinheit der isolierten Plasmid DNA. Je nach Plasmideigenschaften und Menge an Kulturmedium wurden Plasmid DNA Mengen von 200 – 800µg mit einer ratio E_{260}/E_{280} von 1,6 – 1,8 erhalten.

3.4.1.3.6. Kontrollverdau der Plasmide

Ein Restriktionsendonucleaseverdau mit EcoRI war notwendig, um das Vorhandensein eines Inserts zu überprüfen. Der Verdau wurde wie folgt durchgeführt:

5µg Plasmid DNA (aus der Mini Prep bzw. Maxi Prep)
25U EcoRI (pro µg DNA wurden 5U Restriktionsenzym verwendet)
4µl opha Puffer (10x)
ad 20µl H_2O
1h/37°C

Anschließend wurde der Verdau auf einem 1,2%igem Agarosegel aufgetragen. Von den Klonen, die ein Insert enthielten, wurden 8µl der Mini Prep bzw. der Maxi Prep zur Analyse der Basensequenz an die Fa. Sequiserve (Vaterstetten) geschickt. Stimmte die Basensequenz des Inserts mit der Publizierten überein, so wurde von dem betreffenden Klon eine Glycerinkultur angelegt.

3.4.1.3.7. Glycerinkultur

Eine Glycerinkultur dient der langfristigen Aufbewahrung von Bakterienkulturen. Hierzu wurden 800µl Bakteriensuspension den unter (3.4.1.3.4.) hochgezogenen LB Kulturen entnommen und mit 200µl Glycerin versetzt, durch Vortexen gemischt, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

3.4.1.3.8. Aufzeichnungsprotokolle

Die neu hergestellten Klone sind nach dem Gentechnikgesetz (GenTG) durch gentechnische Versuche der Sicherheitsstufe 1 entstanden und somit aufzeichnungspflichtig. Diese gesetzliche Regelung wird durch ein Aufzeichnungsprotokoll erfüllt, das Angaben über den verwendeten Vektor (Vektorkarte), eine kurze Beschreibung des Versuchsvorhabens, den Empfängerorganismus, die verwendeten Primer und über aufgetretene Vorkommnisse enthält.

3.5. Die Methode des RNase Protection Assay

3.5.1. Linearisierung der Plasmide

Die „in vitro Transkription“ macht es erforderlich, dass die Plasmide der Maxi Prep linearisiert werden müssen. Dies geschieht durch geeignete Wahl einer in der Polylinker-Seite des Vektors liegenden Restriktionsschnittstelle, die sich immer nach dem 3´Ende des klonierten Inserts befinden muß.
Das Prinzip der Linearisierung soll am Beispiel für den Adrenomedullinrezeptor verdeutlicht werden. Hier wurde mit dem Restriktionsenzym Eco RV linearisiert (siehe Polylinker-Seite des Vektors pCR®-II-TOPO).

SP6-Bindungsseite.....EcoRI < 3´-[Insert 319 bp] – 5´> EcoRI.....Eco RV

Reaktionsansatz für die Plasmidlinearisierung:

50µg (Plasmid)
250U (Restriktionsenzym z.B. Eco RV)
20µl (10x opha Puffer)
ad 300µl (H_2O_{bidest})
linearisiert wurde für 2h bei 37°C

Die Vollständigkeit der Linearisierung wurde gelelktrophoretisch überprüft. Danach wurde mit Phenol und Chloroform extrahiert und die Konzentration der erhaltenen Plasmid DNA photometrisch bestimmt.

3.5.2. Durchführung der „In vitro Transskription“

Das Enzym SP6 Polymerase, eine DNA abhängige RNA Polymerase, baut hier [α^{32}P] GTP anstatt GTP in einer in vitro Transkription in die cRNA – Sonde ein. Diese radioaktiv markierte cRNA wird nach dem Amersham Riboprobe System® Protokoll der Fa. Amersham Pharmacia hergestellt. Dazu wird folgender Reaktionsansatz verwendet:

0,9µl dNTP(10mmol)
1,2µl 5x Transkriptionspuffer
0,6µl DTT (200mM)
von diesem Mix wurden nun 3,25µl zum Reaktionsansatz zugegeben:
0,8µl RNasin (Promega)
1,0µl (=1µg) linearisierte Plasmid DNA
1,0µl (=80 U) SP6 Polymerase
4,0 µl [α^{32}P] GTP (=40µCi)

Dieser Reaktionsansatz wurde 90min bei 40°C inkubiert. Nicht verbrauchte Plasmid DNA wurde anschließend mit dem Enzym DNAseI (1U) bei 40°C für 30min abgebaut. Danach wurde der Reaktionsansatz mittels Sephadex G50 Säulen, die 3min bei 1000rpm mit TE Puffer (TE + 0,1%iges SDS) equilibriert wurden, von nicht eingebauten radioaktiven Nucleotiden gereinigt, indem der Transkriptionsansatz auf die Säulen gegeben wurde und

dieser 3min bei 1000rpm in Eppendorf Cups abzentrifugiert wurde. Die Eppendorf Cups enthielten das Fällungsreagenz (220µl Ethanol absolut, 10µl Natriumacetat(3M/pH4,8) und 2µl tRNA), das nach dem Abzentrifugieren für 1h bei –20°C gelagert wurde. Nach Abzentrifugieren bei (15000 rpm, 30min, 4°C) der Sonde wurde diese in 100µl Hybridisierungspuffer gelöst und bei 95°C denaturiert. 2µl der so erhaltenen cRNA Sonde wurden in ein Szintillationsglas mit 5ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint®22) gegeben und im ß-Counter gezählt. Die restlichen 98µl wurden bei –20°C aufbewahrt.

3.5.3. Hybridisierung und RNase Protection Assay

Die zu messenden RNA-Proben wurden auf Eis aufgetaut und die benötigten Mengen (1-60µg) in Eppendorf Cups pipettiert. Nach dem Einrotieren des Wassers in der Vakuumzentrifuge wurde das RNA Pellet in 50µl Hybridisierungspuffer gelöst. Gleichzeitig wurden 2µl transfer RNA (tRNA) (10µg/µl) ebenfalls in 50µl Hybridisierungspuffer gelöst. Zu allen Proben und zur vorbereiteten tRNA wurden 500.000cpm radioaktiv markierte cRNA Sonde zupipettiert und zunächst auf 95°C für 15min erhitzt. Die Proben wurden für 12 - 16h bei 60°C auf einem Heizblock bzw. im Wasserbad hybridisiert. Die Aufarbeitung der hybridisierten Proben begann mit dem RNase Verdau, bei dem alle nicht durch Hybridisierung geschützten (=doppelsträngigen) RNA Sequenzen mit RNase A+T1 abgebaut wurden. Dieser Abbau der einzelsträngigen RNA erfolgte bei Raumtemperatur über 30min. Anschließend wurden alle Proteine mit Proteinase K bei 37°C für 30min abgebaut und zur Reinigung des gesamten Ansatzes wurde eine Phenol/Chloroform Extraktion durchgeführt. Aus dem wässrigen Überstand wurde die RNA mit Ethanol und tRNA 1h bei –20°C ausgefällt [400µl Überstand + 900µl Ethanol + 2µl tRNA]. Die Proben wurden dann für 30min bei 4°C abzentrifugiert und nach Absaugen des Überstandes in 5µl Auftragpuffer aufgenommen. Anschließend wurden die Proben 15min bei 95°C denaturiert und auf einem 8% Acrylamidgel mit 1xTBE als Laufpuffer vertikal aufgetrennt.

3.5.4. Gelelektrophorese

Das denaturierende Acrylamidgel wurde bereits am Vortag des Protection Assays unter Verwendung eines Acrylamidgelmixes (Gelphorese® DNA Sequenziersystem) hergestellt. Die Polymerisation des Acrylamides erfolgte durch Zugabe von 10%iger wässriger Ammoniumpersulfatlösung und TEMED (Sigma). Dieser Mix wurde sofort in zwei mit Dimethylsilan hydrophobisierte Glasplatten gegossen und über Nacht polymerisiert. Der Abstand der Glasplatten betrug 0,5 mm. Vor dem Auftragen der Proben lief das Gel bei 80 Watt für 30min mit 1x TBE Puffer vor, die Taschen wurden mit 1xTBE Puffer gespült und die Proben schließlich aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte ca 1,5-2,5h bei 80 Watt. Danach wurde das Gel aus der Elektrophoreseapparatur genommen, die Glasplatten voneinander getrennt und das auf der einen Glasplatte haftende Gel mit einer 10% Methanol und 10% Eisessig enthaltenden wässrigen Lösung 20min fixiert. Das Gel wurde dann auf Whatman-Papier überführt und auf einem 80°C vorgeheizten Geltrockner unter Anlegen eines Vakuums 45-90min getrocknet. Nach dem Trocknen erfolgte die Radioaktivitätsmessung der einzelnen RNA Proben durch das Instant Imagerverfahren. Nach erfolgreicher Zählung wurde zur Kontrolle ein Röntgenfilm auf das getrocknete Gel aufgelegt und in einer Filmkassette bei –80°C je nach zu erwartender Signalstärke für ein bis fünf Tage exponiert.

3.5.5. Auswertung der Imagerdaten und Entwicklung der Röntgenfilme

Die Stärke der Radioaktivität der einzelnen RNA Proben wurde durch die Imagersoftware in cpm (=counts per minute) angegeben. Die Netto cpm wurden erhalten, indem die cpm der RNA Proben mit einem Ausgleichsfaktor (Referenztag der angegebenen Radioaktivität – Tag der Messung = Ausgleichsfaktor) multipliziert wurden und davon der unspezifische Wert der tRNA (in cpm) subtrahiert wurde. Alle Ergebnisse wurden auf diese Netto cpm umgerechnet. Zur Beweissicherung einerseits und Kontrolle des Imagerverfahrens andererseits wurden die dazugehörigen Röntgenfilme entwickelt. Unter roter Beleuchtung wurde zuerst der Film in eine Entwickler-, dann in eine Unterbrecher-, schließlich in eine Fixierlösung gelegt (alle Lösungen sind nach Vorschrift der Fa. Agfa hergestellt worden) und nach Reinigung des Films in Wasser, wurde der Film für 50min in warmer Luft getrocknet.

3.6. RNase Protection Assays

In diesem Punkt sollen die einzelnen RNase Protection Assays für ADM & ADM-R (beide Sonden wurden in Kombination eingesetzt), für ß-Aktin, für EPO und für iNOS näher beschrieben werden.

3.6.1. ADM & ADM-R

3.6.1.1. RNase Protection Assay für ADM und ADM-R

Die beiden cRNA Sonden wurden in Kombination im RNase Protection Assay eingesetzt. Um zu testen, ob die Sondenkombination bei der Hybridisierung zu unerwünschten Kreuzreaktionen und zu gleichen cpm-Werten der einzelnen Hybride führt, wurden die Sonden einzeln und in Kombination mit jeweils gleichen RNA Mengen hybridisiert. Es wurden bei den Einzelansätzen für 20µg Total RNA aus der normoxischen Lunge für ADM 30 cpm und für ADM-R 170 cpm erhalten, wobei die Kombination der beiden Sonden für 20µg Total RNA für ADM 32 cpm und für ADM-R 165 cpm ergab. Das Ergebnis zeigte, dass die Mischung der Sonden möglich ist, da es weder zu Kreuzreaktionen noch zu stark abweichenden cpm Werten gekommen war. Für die Quantifizierung der ADM & ADM-R mRNAs wurden die beiden Sonden miteinander gemischt.

3.6.1.2. Eingesetzte RNA Mengen für die ADM und ADM-R Sonden

Für die ADM & ADMR Kombination wurden 20µg von allen verwendeten Geweben eingesetzt. Für die Zellkulturen wurden ebenfalls 20µg eingesetzt, wobei nur bei den Hepatozyten die ADM & ADMR Kombination (Daten für die ADM-R mRNA Expression werden nicht gezeigt) verwendet wurde. Bei der RNA von Mesangialzellen, glatten Aortengefäßmuskelzellen und glomerulären Endothelzellen wurde die ADM Sonde einzeln eingesetzt, da diese drei Zelltypen selbst bei 80µg RNA mit der ADM-R Sonde kein auswertbares Signal ergaben.

3.6.2. ß-Aktin

3.6.2.1. ß-Aktin RNase Protection Assays

Bei vielen Untersuchungen zur Genexpression werden konstitutiv exprimierte Gene als eine Art Standard, der über die Qualität der verwendeten RNA und die Versuchsdurchführung Aufschluß gibt, verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde die mRNA des ß-Aktins als „Haushaltsgen“ in allen verwendeten Geweben und Zellkulturen quantifiziert und das Ergebnis der anderen mRNAs auf diese Werte bezogen.

3.6.2.2. Eingesetzte RNA Mengen für die Aktin Sonde

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Quantifizierung der ß-Aktin mRNA 1µg Total RNA von den verwendeten Geweben und 2µg Total RNA von den Zellkulturen eingesetzt.

3.6.3. Erythropoietin

3.6.3.1. EPO Protection Assays

Eine Besonderheit der klonierten EPO Sonde, die aus 432 Basen besteht, ist, dass bei der Hybridisierung der EPO cRNA mit der mRNA nur ein 132 bp großes Hybrid ensteht. Dieses enthält die mRNA des Exon V des EPO Gens der Ratte. Die restlichen 300 Basen der EPO Sonde interagieren mit dem Intron IV des EPO Gens und weisen im Falle der Detektion von 432 bp Hybridenbanden auf eine Verunreinigung der RNA Probe mit DNA hin. Ist in der RNA Probe keine DNA Verunreinigung enthalten, so gibt es für die 300 bp keinen Hybridisierungspartner und diese werden dann durch die RNase A + T1 abgebaut.

3.6.3.2. Eingesetzte RNA Mengen für die EPO Sonde

Die EPO mRNA Expression wurde im Nieren- und im Lebergewebe bestimmt. Von der Nieren RNA wurden 60µg Total RNA und von der Leber RNA wurden 200µg Total RNA eingesetzt.

3.6.4. Induzierbare NO Synthase (iNOS)

3.6.4.1. I-NOS RNase Protection Assay

Die Messung der iNOS mRNA Expression diente als ein Qualitätsmerkmal für die eingesetzten Zytokine.

3.6.4.2. Eingesetzte RNA Mengen für die iNOS Sonde

Eine iNOS mRNA Abundanz konnte nur in den mit Zytokinen behandelten Zellkulturen bestimmt werden. Von den Zellkulturen wurden jeweils 20µg Total RNA eingesetzt.

3.7. Proteinbestimmung

3.7.1. Bestimmung von Adrenomedullin im Blutplasma der Ratte

Blutserum (die Gewinnung wurde unter (3.2.1.) beschrieben) wurde 1:1 mit Puffer A [1% Trifluoressigsäure (TFA)] versetzt, kräftig gevortext und bei 10000g für 20min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine äquilibrierte C_{18} Säule (Millipore) gegeben, wobei die Äquilibrierung mit 1ml Puffer B [60% Acetonitril in 1% TFA] erfolgte. Die an die C_{18} Säule gebundenen Proteine wurden 3 mal mit je 3ml des Puffers A gewaschen, dann mit 3ml des Puffers B eluiert und in 15ml Polystyrolröhrchen gesammelt. Die Lösung wurde anschließend in der Vakuumzentrifuge zur Trockne einrotiert und der erhaltene Rückstand wurde in 250µl RIA Puffer [Phoenix Pharmaceuticals] wieder gelöst. Das im RIA Buffer enthaltene Adrenomedullin wurde mit einem Radio Immuno Assay bestimmt [(RIA) Phoenix Pharmaceuticals], der neben radioaktiven J^{125}ADM auch einen Antikörper gegen das ADM der Ratte enthielt. Für den RIA wurden pro Probe 100µl eingesetzt.

3.7.2. Adrenomedullinbestimmung in verschiedenen Rattengeweben

Die unter 3.2.1. gewonnenen Organe wurden in 5ml/g Lysispuffer (10mmol/L Tris, pH 7,4) homogenisiert und die Homogenate bei 1600g für 15min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde ebenfalls auf eine zuvor mit 1ml Puffer B äquilibrierte Säule gegeben, die Proteinisolierung und die nachfolgende Bestimmung des Adrenomedullins erfolgte wie unter 3.7.1. beschrieben.

3.8. Bestimmung des cGMP Gehaltes in A7r5 AVSMC

Der cGMP Gehalt in den A7r5 AVSMC wurde mit einem Radio Immuno Assay (Assay Designs) bestimmt. Die Lyse der Zellen, die Isolierung des cGMPs und dessen Konzentrationsbestimmung durch den RIA wurden laut dem Protokoll der Firma Assay Designs ausgeführt.

3.9. Statistik

Als statistische Größen wurden die arithmetischen Mittelwerte, deren Standardabweichung (SD) und die statistische Schwankung der Mittelwerte (SEM) verwendet.
Die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) wurde für interindividuelle Vergleiche und der zweiseitige student´s t-test für intraindividuelle Vergleiche verwendet.

Die folgenden Irrtumswahrscheinlichkeiten P wurden als statistisch signifikant betrachtet:

$P < 0,05$ *
$P < 0,01$ **
$P < 0,001$ ***

4. Ergebnisse

4.1. Einfluss von Hypoxie auf das ADM System

4.1.1. In vivo Ergebnisse

4.1.1.1. Basale ADM mRNA und ADM-R mRNA Expression

Zur graphischen Darstellung der Adrenomedullin (ADM) mRNA bzw. Adrenomedullin-Rezeptor (ADM-R) mRNA Expression der Organe wurden die Expressionswerte auf die mRNA Expression des Haushaltsgenes ß-Aktin bezogen. Aus dem Quotienten ADM (bzw. ADM-R) mRNA [in cpm/µg Total RNA] durch ß-Aktin mRNA [in cpm/µg Total RNA] war die basale Expression der einzelnen mRNAs in den Organen jedoch nicht ersichtlich.
Daher wurde (Abb. 1) die basale ADM, ADM-R und ß-Aktin mRNA Expression [in cpm/µg Total RNA] der verschiedenen Organe und Körpergewebe von männlichen Sprague Dawley Ratten auf 1µg Total RNA bezogen, um die absolute ADM, ADM-R bzw. ß-Aktin Genexpression der Organe und Aorta unter Normoxie zu erhalten und um somit eine mögliche physiologische Bedeutung von ADM bzw. vom ADM-Rezeptor in einzelnen Organen zu erkennen.

Die basale ADM mRNA Expression war in den Nebennieren am größten (2,9 cpm/µg Total RNA), gefolgt von Lunge (1,5 cpm/µg Total RNA), Niere (0,9 cpm/µg Total RNA) und Herz (0,6 cpm/µg Total RNA). Das Gehirn, die Aorta und die Leber zeigten nur eine geringe ADM mRNA Abundanz (Abb. 6).
Die basale Expression des ADM-R Genes war mit 7,8 cpm/µg Total RNA in der Lunge am größten. Auch in den Nebennieren und der Leber wurde eine ADM-R mRNA Expression von 4,2 cpm/µg Total RNA und 1,4 cpm/µg Total RNA gemessen. Die ADM-R Genexpression im Herz, in den Nieren und im Gehirn war gering (> 0,4 cpm/µg Total RNA). Auch die basale ADM-R mRNA Genexpression in den Aorten lag an der Nachweisgrenze.

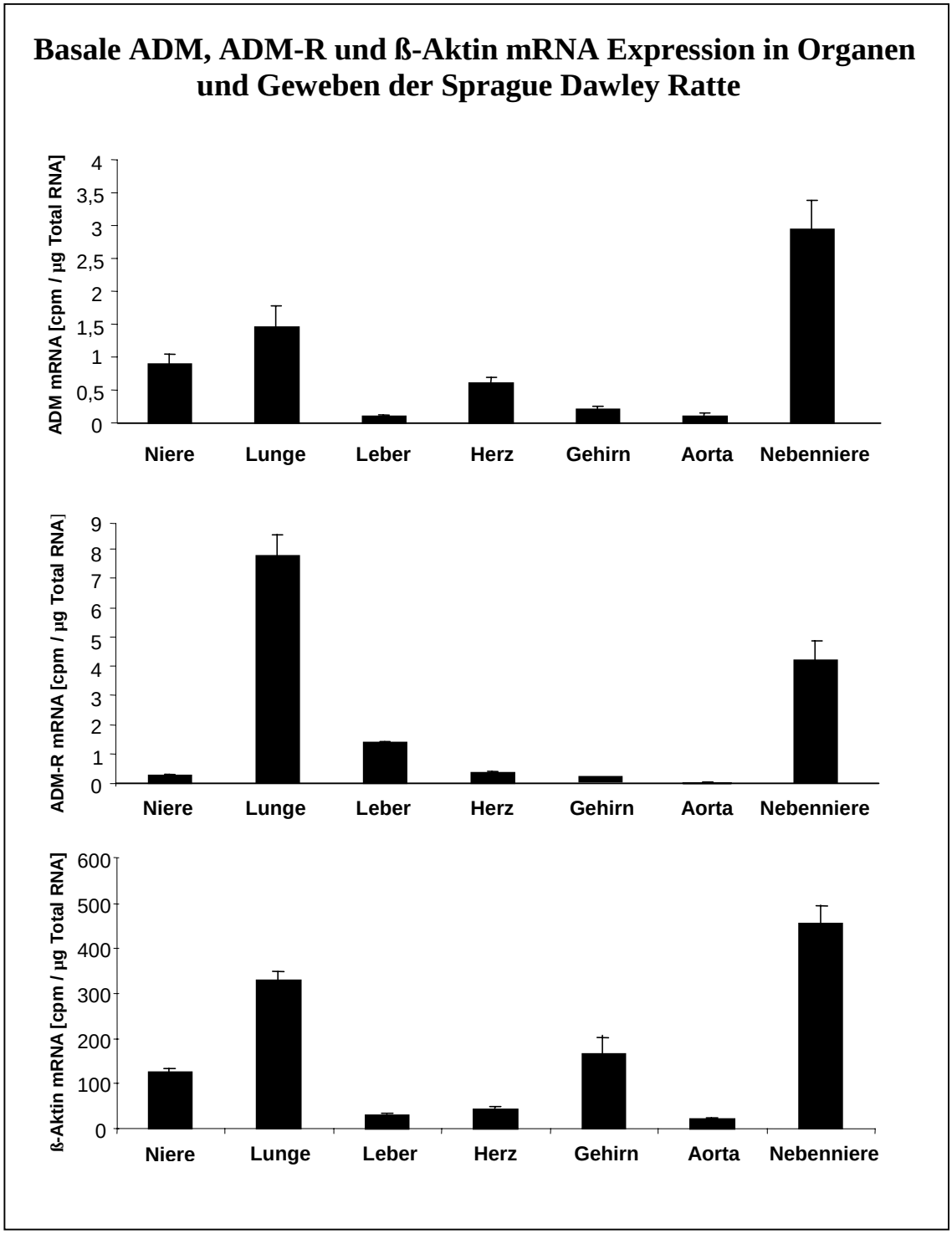

Abbildung 6: Die basale Genexpression der ADM, ADM-R und ß-Aktin mRNA und deren Verteilung in den verschiedenen Organen sowie der Aorta der männlichen Sprague Dawley Ratte wurde mit dem RNase Protection Assay bestimmt. Die Werte sind angegeben in counts per min (cpm) pro µg Total RNA. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte ± SEM aus acht Organen bei der Niere, Lunge, Leber, dem Herzen und den Nebennieren dar (n=8). Bei dem Gehirn und der Aorta setzen sich die Mittelwerte ± SEM aus vier Organen zusammen (n=4).

4.1.1.2. Einfluss von Hypoxie auf die ADM mRNA und ADM-R mRNA Genexpression

Um die Wirkung von Hypoxie auf die ADM und ADM-R Genexpression untersuchen zu können, wurden männliche Sprague Dawley Ratten für 6h mit normaler Atemluft, einem Gasgemisch aus 8%O_2 und 92%N_2 (im folgenden als Hypoxie 8%O_2 bezeichnet), Atemluft mit einem Zusatz von 0,1% Kohlenmonoxid bzw. mit Kobalt-II-chlorid (intraperitoneale Injektion von 60 mg/kg) behandelt, anschließend getötet und die Organe, Gewebe und das Blut entnommen. In den Organen und Geweben wurden sowohl die ADM und ADM-R mRNA Abundanz als auch die ADM Proteinkonzentration bestimmt. Im Blutplasma wurde der Adrenomedullingehalt gemessen.

4.1.1.2.1. Einfluss von Hypoxie auf die Erythropoietin (EPO) mRNA Genexpression in der Niere und in der Leber

Die Bestimmung einer möglichen Induktion der ADM bzw. ADM-R Genexpression durch Hypoxie setzte voraus, dass die hypoxischen Manöver sauerstoffregulierte Gene auch induzierten. Als Nachweis einer Stimulation von sauerstoffregulierten Genen durch Hypoxie diente eine Erhöhung der mRNA Abundanz des Erythropoietingens, welches ein klassisches durch Hypoxie induzierbares Gen ist. Sauerstoffregulierte Gene wie EPO können durch eine direkte Verminderung des Sauerstoffangebots (Hypoxie), als auch durch Kohlenmonoxid sowie durch Co^{2+} induziert werden. Die Niere bzw. Leber sind die hauptsächlichen Syntheseorte des Erythropoietins (EPO) und wurden daher auf eine erhöhte EPO mRNA Expression bei Hypoxie untersucht.

Die Abbildung 7 zeigt die Erythropoietin Genexpression in der Niere bzw. in der Leber unter verschiedenen Hypoxiestimuli.

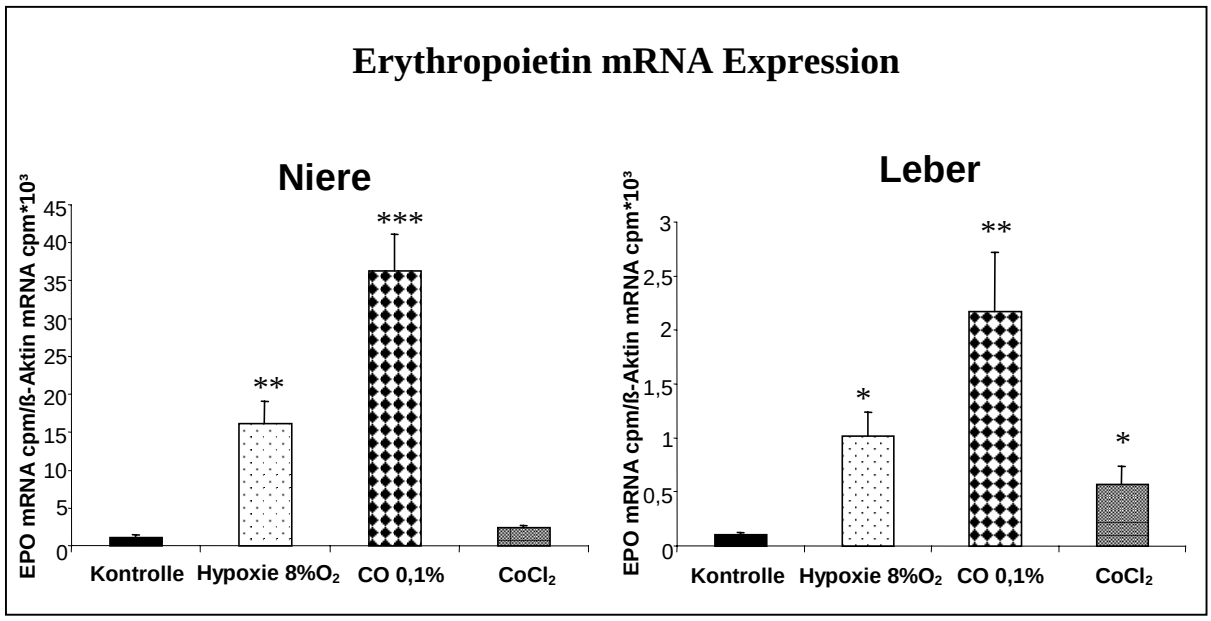

Abbildung 7: Erythropoietin mRNA Expression in der Niere und Leber. Die Ergebnisse sind als EPO mRNA cpm pro ß-Aktin mRNA cpm multipliziert mit dem Faktor 1000 angegeben. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte ± SEM aus jeweils 4 Tieren dar (n=4) (*P<0,05 vs. Kontrolle; **P<0,01 vs. Kontrolle; ***P<0,001 vs. Kontrolle).

4.1.1.2.2. Einfluss von Hypoxie auf die ADM und ADM-R mRNA Expression in der Niere und Leber

Nachdem die erfolgreiche Hypoxiebehandlung durch die Bestimmung der EPO mRNA bestätigt wurde, wurden die ADM, ADM-R und ß-Aktin mRNA Expressionen in allen Organen und der Aorta bestimmt.

In den Nieren (Abb. 8) bewirkte Kohlenmonoxid im Vergleich zu den Kontrollbedingungen sowohl einen Anstieg der ADM mRNA (3,4 fach; (P<0,001)) als auch einen Anstieg der ADM-R mRNA (1,7 fach; (P<0,05)).
Hypoxie 8%O_2 führte ebenfalls zu einer ADM mRNA – (2,3 fach; (P<0,01)) und einer ADM-R mRNA Erhöhung (1,8 fach; (P>0,05)).
Das intraperitoneal injizierte $CoCl_2$ zeigte dagegen nur einen moderaten Anstieg der ADM bzw. ADM-R mRNA (1,3 fach; (P>0,05) und 1,4 fach; (P>0,05)), so dass sich eine Reihenfolge in der Effektivität der Stimulation von CO > O_2–Mangel >> $CoCl_2$ ergab, wobei die Genexpression von ADM stärker induziert wurde als die von ADM-R.

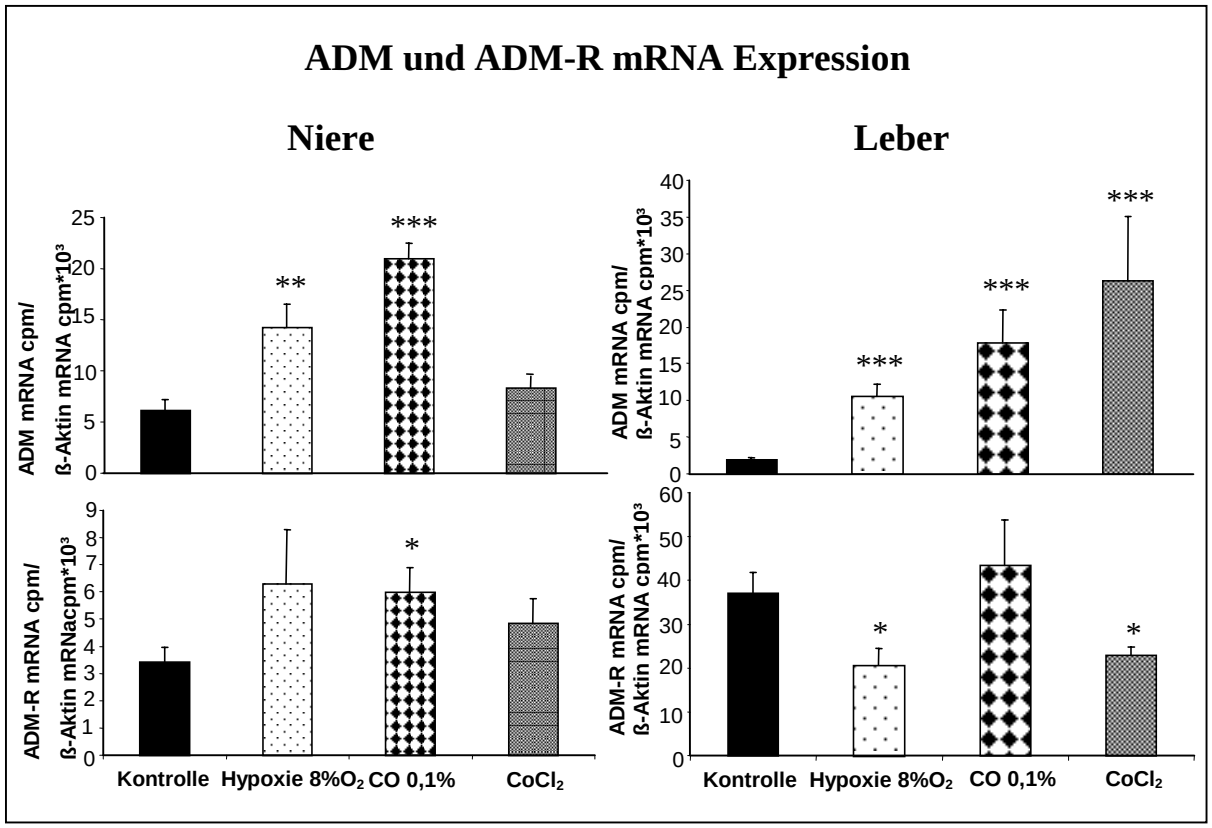

Abbildung 8: Einfluss von Hypoxie 8%O_2, Kohlenmonoxid (0,1%) und Kobalt-II-chlorid auf die ADM und ADM-R mRNA Expression in der Rattenniere bzw. -leber. Die ADM und ADM-R mRNA cpm wurden auf ß-Aktin mRNA cpm bezogen und mit dem Faktor 1000 multipliziert. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte ± SEM aus jeweils 8 Kontroll- bzw. 8 mit $CoCl_2$ (60 mg/kg) behandelten Tieren (n=8), aus 7 mit Kohlenmonoxid behandelten Tieren (n=7) und aus 6 mit Hypoxie behandelten Tieren dar (n=6). Die Versuchsdauer betrug 6 Stunden (*P<0,05 vs. Kontrolle; **P<0,01 vs. Kontrolle; ***P<0,001 vs. Kontrolle).

Auch die ADM mRNA Expression in der Leber (Abb. 8) wurde durch alle 3 Hypoxieformen induziert (P<0,001). Kobalt-II-chlorid war mit einer 14-fachen Steigerung der ADM mRNA Expression die am besten wirksame Form der Hypoxie.
Hingegen wurde die ADM-R Genexpression (Abb. 8) in der Leber durch Hypoxie- bzw. Kobalt gehemmt. Kohlenmonoxid änderte die ADM-R mRNA Expression nicht.

4.1.1.2.3. Einfluss von Hypoxie auf die ADM und ADM-R mRNA in Lunge, Herz, Gehirn, Aorta und Nebenniere

Nachdem auch die ADM bzw. ADM-R Genexpression in der Niere bzw. Leber durch die Hypoxieformen induziert werden konnte, wurde die ADM bzw. ADM-R mRNA Expression

in der Lunge, im Herz, im Gehirn, in den Nebennieren und im Aortengewebe untersucht, um einen möglichen generellen Effekt von Hypoxie auf die ADM bzw. ADM-R Genexpression nachzuweisen.

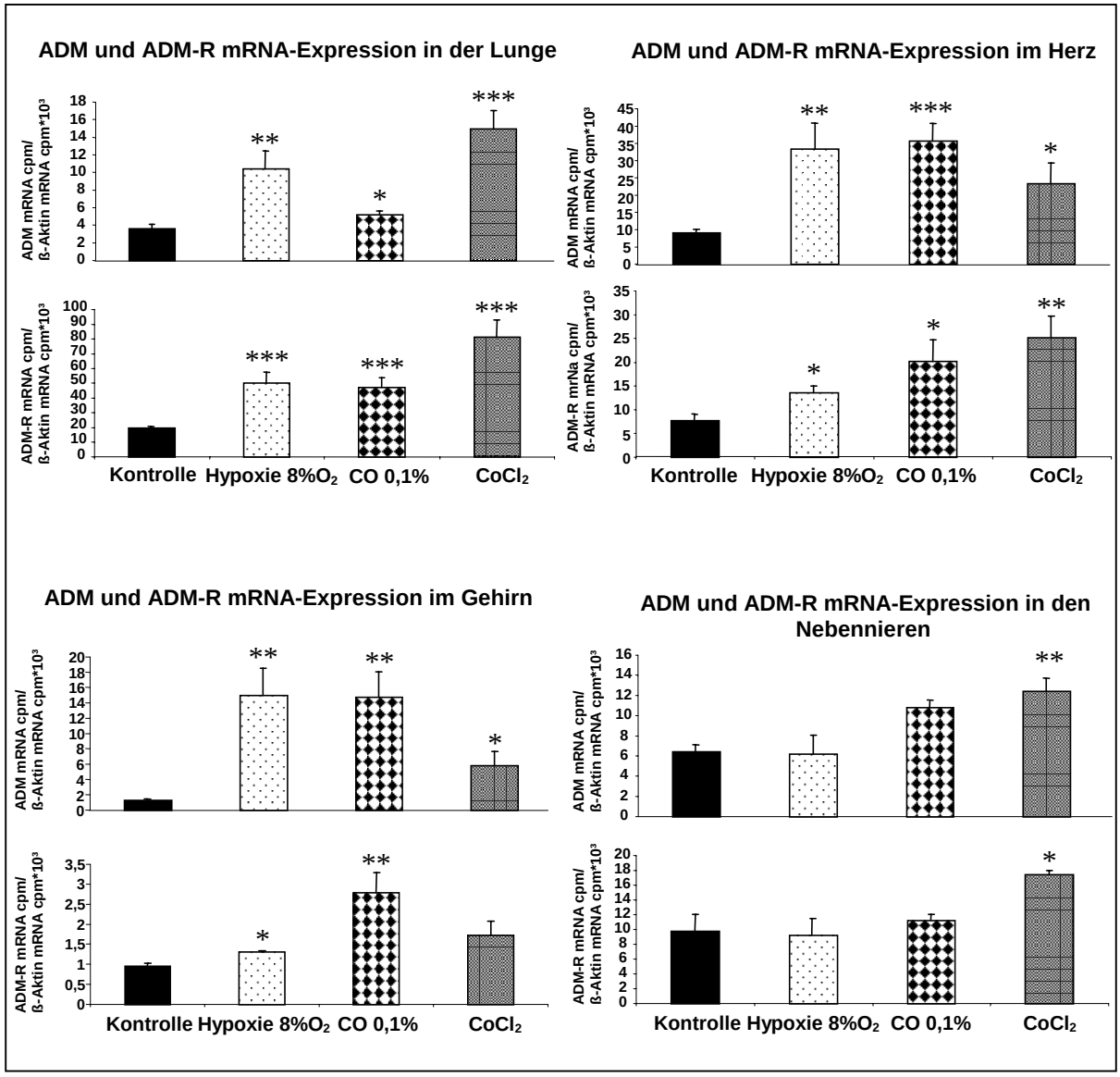

Abbildung 9: Einfluss von Hypoxie (8%O_2), Kohlenmonoxid (0,1%) und Kobalt-II-chlorid (60mg/kg) auf die ADM und ADM-R mRNA Expression in der Rattenlunge, im Rattenherz, dem Rattengehirn und der Rattennebenniere. Die ADM und ADM-R mRNA cpm wurden auf ß-Aktin mRNA cpm bezogen und mit dem Faktor 1000 multipliziert. Für alle Mittelwerte wurde die SEM berechnet. Die Anzahl der Kontroll- und der mit $CoCl_2$ behandelten Tiere betrug bei den Lungen, Herzen und Nebennieren je 8 (n=8), bei den Gehirnen 4 (n=4), die Anzahl der mit Kohlenmonoxid behandelten Tiere betrug bei den Lungen, Herzen und Nebennieren aus je 7 (n=7) bzw. bei den Gehirnen 4 Tiere (n=4) und die Anzahl der mit Hypoxie behandelten Tiere betrug bei den Lungen, Herzen und Nebennieren je 6 (n=6) bzw. bei den Gehirnen 4 (n=4). Die Tiere waren für sechs Stunden den obigen Versuchsbedingungen ausgesetzt (*P<0,05 vs. Kontrolle; **P<0,01 vs. Kontrolle; ***P<0,001 vs. Kontrolle).

In der Lunge, im Herz, im Gehirn, in den Nebennieren (Abb.9) und in der Aorta (Abb. 10) wurde die ADM und ADM-R Genexpression durch Hypoxie, Kohlenmonoxid bzw. Kobalt-II-chlorid ebenfalls induziert. Hypoxie (8%O_2) und CO (0,1%) waren effiziente Aktivatoren der ADM Genexpression im Herzen, im Gehirn und in der Aorta. In der Lunge wie in der Nebenniere war jedoch Kobalt (II) der effizienteste Aktivator der ADM Genexpression. Als Besonderheit zeigte die Behandlung mit Kohlenmonoxid in der Lunge im Gegensatz zu allen Organen bzw. Körpergeweben nur eine moderate, aber dennoch signifikante ($P<0,05$) Induktion der ADM Genexpression.

Die ADM-R mRNA Expression wurde in der Lunge, in den Nebennieren und im Herz durch Kobalt (II), im Gehirn und in der Aorta jedoch durch Kohlenmonoxid am stärksten induziert (Abb. 9, 10).

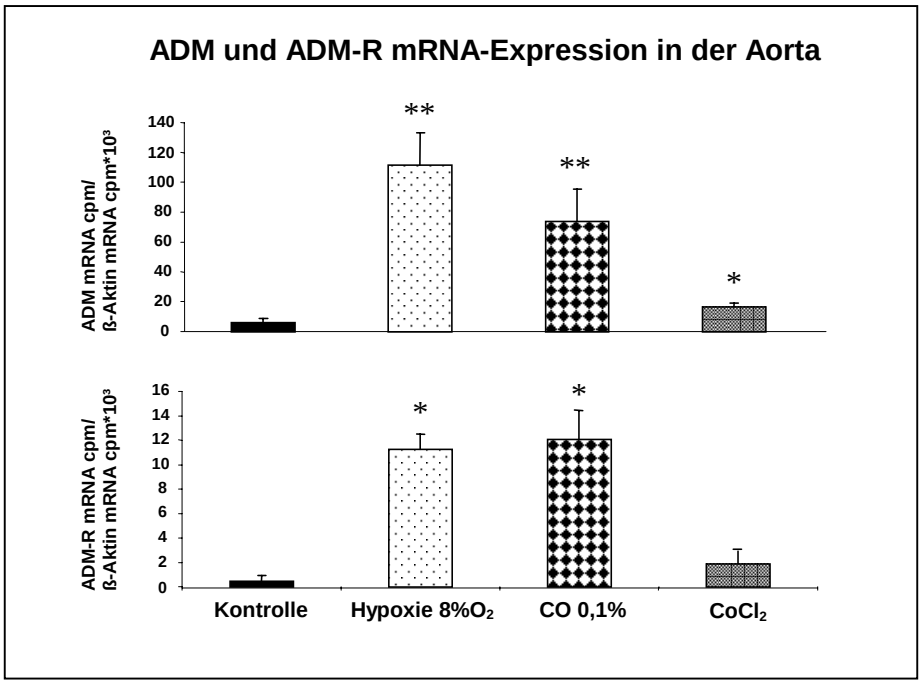

Abbildung 10: Einfluss von Hypoxie 8%O_2, Kohlenmonoxid (0,1%) und Kobalt-II-chlorid auf die ADM und ADM-R mRNA Expression in der Rattenaorta. Kontrollen waren unbehandelt. Die ADM und ADM-R mRNA cpm wurden auf ß-Aktin mRNA cpm bezogen und mit dem Faktor 1000 multipliziert. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte ± SEM aus jeweils 4 Tieren dar (n=4) (*$P<0,05$ vs. Kontrolle; **$P<0,01$ vs. Kontrolle).

4.1.1.2.4. Einfluss von Hypoxie auf die ADM und ADM-R mRNA Expression in den Nierenzonen

Wie die Abb. 8 – 10 zeigen, wurde die ADM bzw. ADM-R mRNA Expression in der Niere und den Organen bzw. Geweben durch alle 3 Hypoxieformen induziert, wobei die Stärke der

Induktion der ADM bzw. ADM-R Genexpression vom Organ und von der Hypoxieform abhängig war. Deshalb stellte sich die Frage, ob die ADM bzw. ADM-R mRNA durch die hypoxischen Manöver im gesamten Organ bzw. Gewebe gleichmäßig oder unterschiedlich induziert wurde. Dies wurde in der Niere, die leicht in die Bereiche Nierenkortex, äußeres und inneres Nierenmark aufgeteilt werden kann, untersucht, indem auch in den Nierenzonen die ADM und ADM-R mRNA Expression bestimmt wurde (Abb. 11).

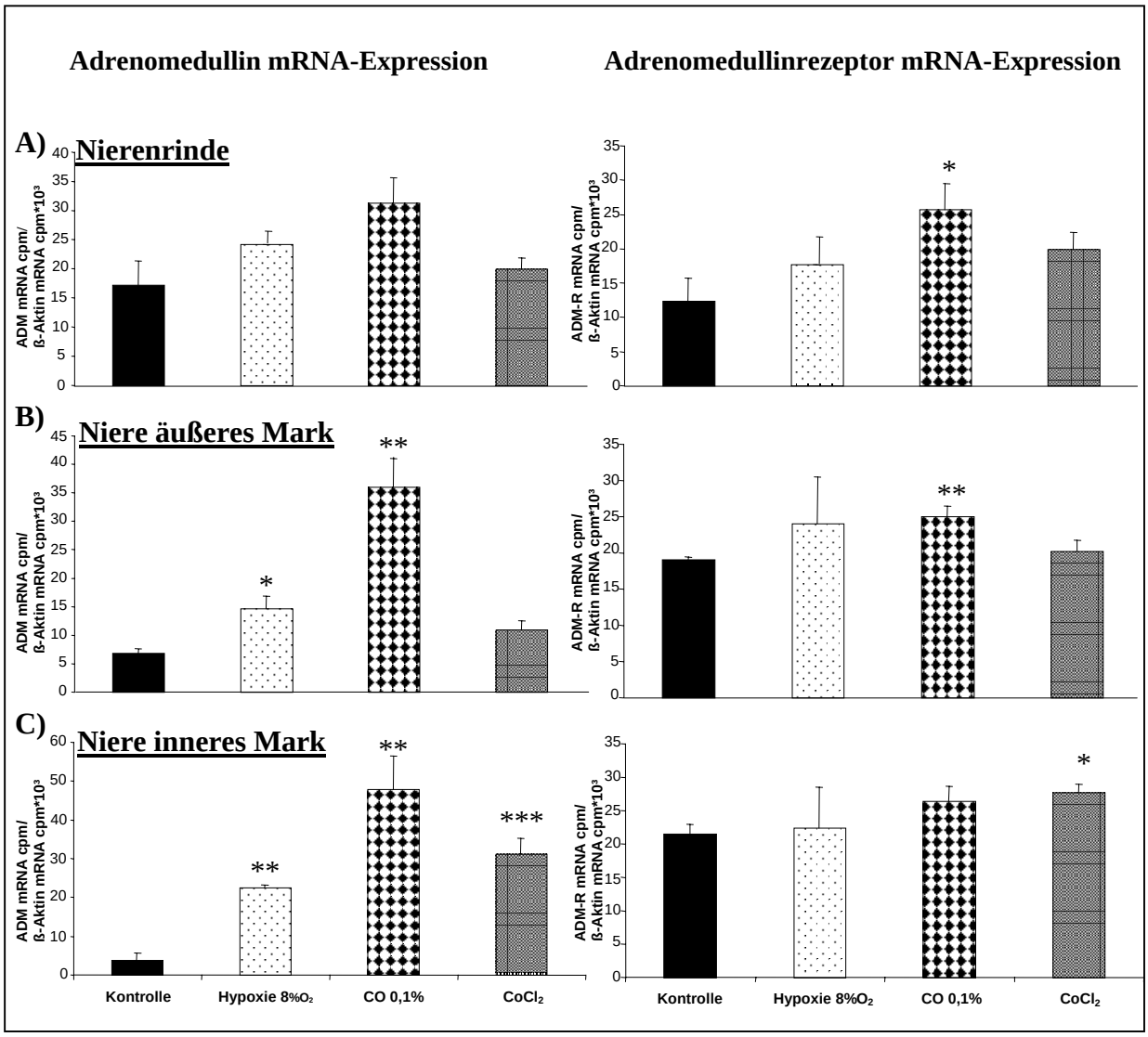

Abbildung 11: Die Teile A), B) und C) zeigen die ADM bzw. ADM-R mRNA-Expression in den Nierenzonen unter Normoxie (= Kontrolle) und den Hypoxiestimuli. Die ADM und ADM-R mRNA cpm wurden auf ß-Aktin mRNA cpm bezogen und mit dem Faktor 1000 multipliziert. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte ± SEM aus jeweils vier Tieren dar (n=4) (*P<0,05 vs. Kontrolle; **P<0,01 vs. Kontrolle; ***P<0,001 vs. Kontrolle).

Die ADM-R mRNA Genexpression wurde durch die hypoxischen Manöver im Vergleich zur ADM mRNA Expression geringer induziert [Abb. 11 A); B); C);]. Im Gegensatz zum ADM Gen, das im inneren Nierenmark am stärksten aktiviert wurde, wurde die ADM-R mRNA im Nierenkortex durch die Hypoxieformen am stärksten exprimiert.

Wie die Abbildungen 8 und 11 A) zeigen, war die ADM mRNA und ADM-R mRNA Genexpression im Nierenkortex, aus dem die Niere zu 90% besteht, mit der in der Niere vergleichbar (Abb. 8).

4.1.1.3. Proteinbestimmung des Adrenomedullins

Durch RNase Protection wurde gezeigt, dass die hypoxischen Manöver die ADM Genexpression induzierten. Um zu untersuchen, ob die erhöhte ADM mRNA Abundanz auch zu einer erhöhten Proteinsynthese führte, wurde das Blutplasma und einige Organe von Sprague Dawley Ratten auf den Gehalt an immunoreaktiven (ir) Adrenomedullin mit einem Radio Immuno Assay (RIA) untersucht. Die Abb. 12 zeigt, dass die ir-ADM Konzentrationen unter Hypoxie (8%O_2) (2 fach), unter Kohlenmonoxid (0,1%) (1,8 fach) und unter $CoCl_2$ (1,5 fach) im Vergleich zu den Kontrollen im Blutplasma anstiegen. Die hypoxischen Organe wiesen ebenfalls höhere ir-ADM Werte als die Kontrollorgane auf (Tabelle 3).

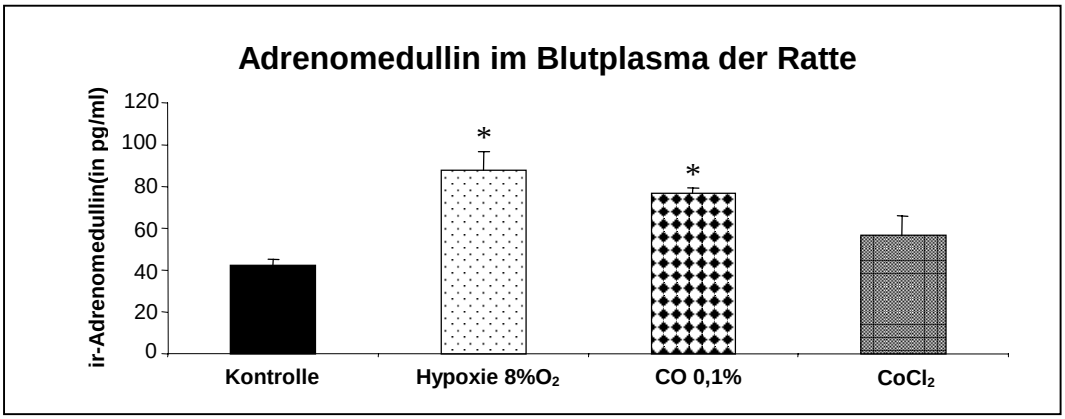

Abbildung 12: Immunoreaktives Adrenomedullin im Blutplasma von Sprague Dawley Ratten; Bedingungen: Normoxie (= Kontrolle), Hypoxie 8%O_2, Kohlenmonoxid (0,1%) und Kobalt-II-chlorid (60mg/kg) für je 6h; Die ir-ADM-Werte sind in pg/ml Blutplasma angegeben und stellen Mittelwerte ± SEM aus 4 Tieren dar (n=4) (*P<0,05 vs. Kontrolle).

Organe	***Kontrollwert***	***Hypoxie 8%O_2***	***Signifikanz P***
Niere	522 ± 50	880 ± 70	< 0,05
Lunge	3567 ± 1352	8938 ± 938	< 0,05
Herz	922 ± 140	1699 ± 255	< 0,05
Gehirn	595 ± 82	1120 ± 210	< 0,05
Leber	475 ± 145	1122 ± 67	< 0,05

Tabelle 3: Immunoreaktives Adrenomedullin in Organen der Sprague Dawley Ratte; Die Tiere wurden für 6h normoxischen (= Kontrollen) und hypoxischen (8%O_2) Bedingungen ausgesetzt. n=4 pro Bedingung. Die Werte sind in pg ir-ADM pro g Organgewebe angegeben.

4.1.2. In vitro Ergebnisse: Adrenomedullin mRNA Expression in Primärzellkulturen und Zelllinien unter Hypoxie

Wie die in vivo Versuche zeigten, war die Regulation der ADM Genexpression in den Organen unterschiedlich stark, einerseits abhängig vom Organ andererseits abhängig von der Art des Hypoxiestimulus. Weil nun Organe bzw. Gewebe aus unterschiedlichen Zelltypen aufgebaut sind, die unterschiedlich stark mit O_2 versorgt werden, lag die Frage nahe, ob zelltypabhängig eine individuelle Regulation des ADM Genes erfolgt. Um dies abzuklären, wurde daher versucht, die ADM mRNA Expression in einzelnen Zelltypen zu bestimmen, die auch in den untersuchten Organen vorkommen. Dazu wurden verschiedene Primärkulturen bzw. Zelllinien verwendet. So wurde die in vitro Situation vor allem an der Zelllinie A7r5 AVSMC, einer glatten Aortengefäßmuskelzelllinie von BDXI Ratten (ATCC CRL 1444), durchgeführt, da es Hinweise darauf gibt, dass glatte Gefäßmuskelzellen, die den vasodilatierenden Effekt bewirken, einen wichtigen Syntheseort für ADM darstellen (Hinson et al. 2000). Desweiteren wurden eine glomeruläre Endothelzelllinie von Sprague Dawley Ratten (DSMZ Braunschweig, Deutschland ACC 262) sowie Primärkulturen von glomerulären Mesangialzellen und Hepatozyten für die Untersuchungen verwendet.

4.1.2.1. Einfluss von Hypoxie auf die Adrenomedullin mRNA Abundanz in A7r5 AVSMC

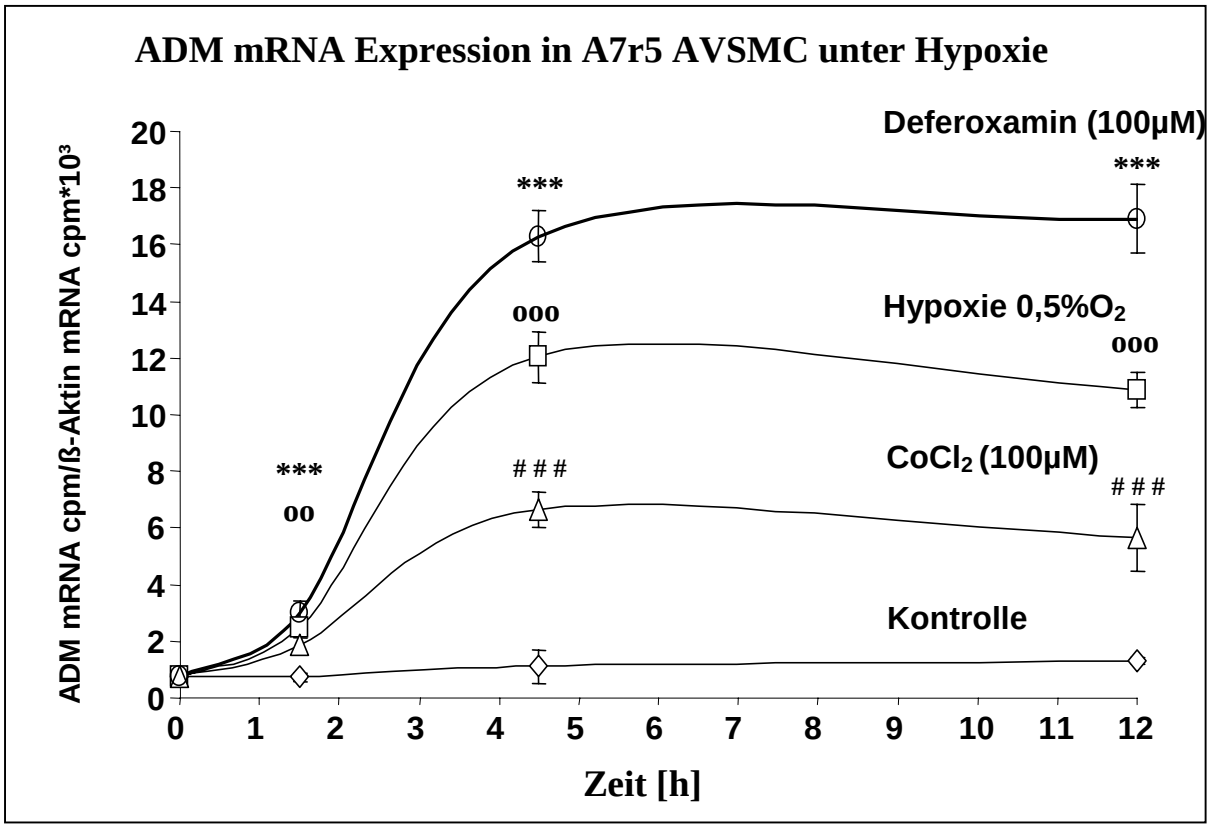

Abbildung 13: ADM mRNA Expression in A7r5 AVSMC unter Normoxie (= Kontrolle), Hypoxie ($0,5\%O_2$), Deferoxamin (100µM) und $CoCl_2$ (100µM) für 1,5h, 4,5h und 12h; die Werte für die ADM mRNA Expression wurden auf die ß-Aktin mRNA bezogen, mit dem Faktor 1000 multipliziert und stellen Mittelwerte ± SEM aus 6 Einzelwerten dar ($^{\#\ \#\ \#}P<0,001$ vs. Kontrolle; $^{oo}P<0,01$ vs. Kontrolle; $^{ooo}P<0,001$ vs. Kontrolle; ***P<0,001 vs. Kontrolle).

Die Abbildung 13 zeigt die zeitabhängigen Einflüsse von Hypoxie ($0,5\%O_2$), Deferoxamin (DFX) (100µM) [DFX ist ein Komplexbildner mit einer hohen Affinität für Fe^{2+} und induziert wie O_2 – Mangel sauerstoffregulierte Gene (Bianchi et al. 1999);] und Kobalt-II-chlorid (100µM) auf die ADM mRNA Expression. Bereits nach 1,5h wurde die ADM mRNA Expression durch die hypoxischen Manöver im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle stärker induziert (DFX: 3,5 fach; Hypoxie :3 fach; $CoCl_2$: 2 fach), wobei die ADM mRNA Expression nach 4,5h (DFX: 16 fach; Hypoxie: 11 fach; $CoCl_2$: 6 fach) und nach 12h (DFX: 16 fach; Hypoxie: 8,5 fach; $CoCl_2$ 4,5 fach) nochmals stark anstieg. Bei Deferoxaminbehandlung war nach 4,5h ein Plateau der ADM mRNA Abundanz in A7r5 AVSMC erreicht.

4.1.2.2. ADM mRNA Expression in Primärkulturen von Hepatozyten und glomerulären Mesangialzellen sowie in der Zelllinie von glomerulären Endothelzellen

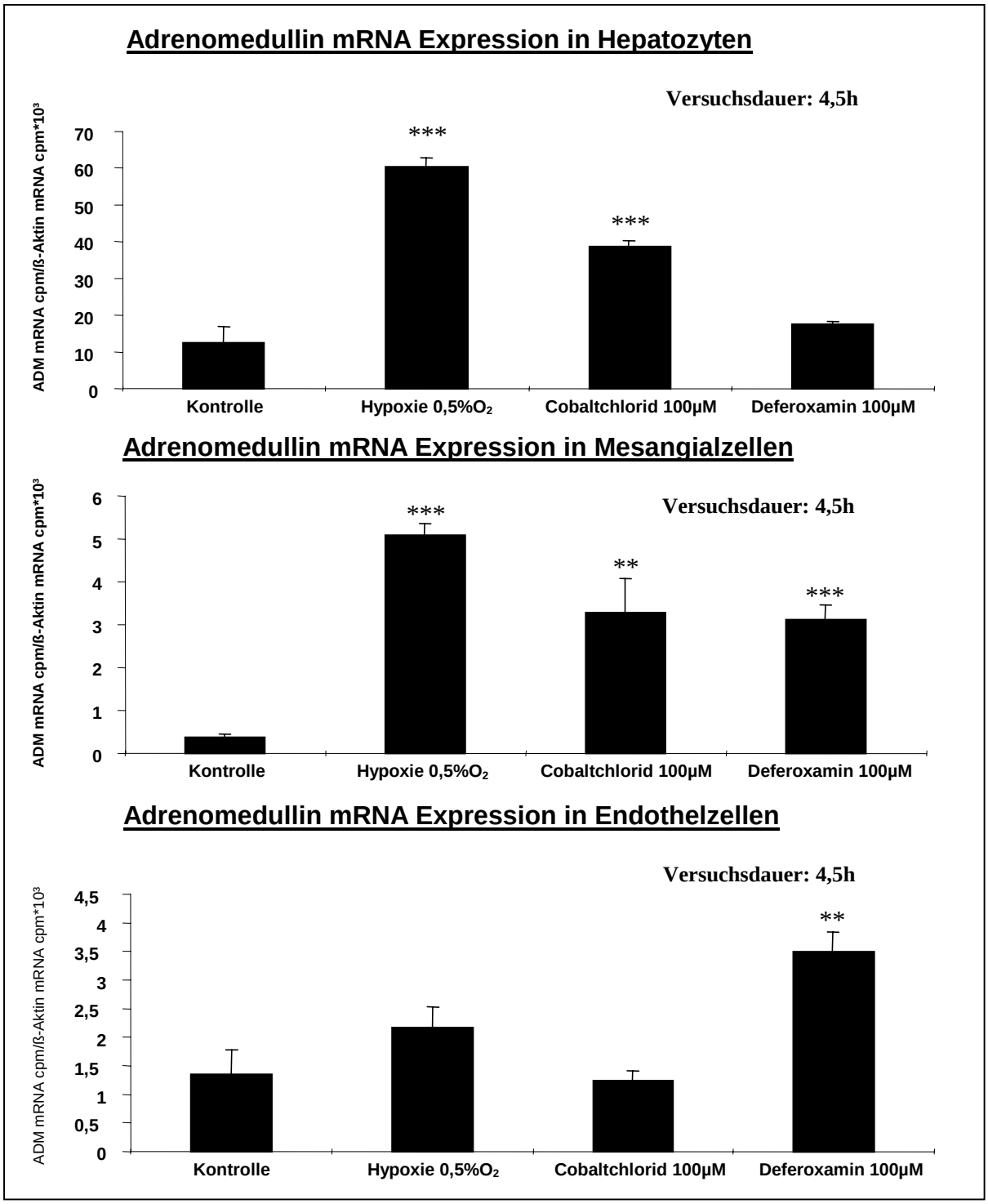

Abbildung 14: Die ADM mRNA Expression wurde in Primärkulturen von Hepatozyten und Mesangialzellen bzw. glomerulären Endothelzellen (ACC262) unter Normoxie, Hypoxie (0,5%O_2), Deferoxamin (100µM) und $CoCl_2$ (100µM) bestimmt. Die Versuchsdauer betrug 4,5h. Die dargestellten Werte wurden aus dem Quotienten ADM mRNA cpm durch ß-Aktin mRNA cpm und dem Faktor 1000 berechnet und stellen Mittelwerte ± SEM aus 6 Einzelwerten dar (n=6) (**P<0,01 vs. Kontrolle; ***P<0,001 vs. Kontrolle).

Hepatozyten und glomeruläre Mesangialzellen bzw. die glomeruläre Endothelzelllinie reagierten auf Hypoxie, DFX bzw. $CoCl_2$ mit einer unterschiedlichen ADM mRNA Expression.

So zeigte sich, dass in Mesangialzellen und Hepatozyten Hypoxie ($0{,}5\%O_2$) die ADM mRNA am stärksten induzierte (13 fach und 5 fach), während in den glomerulären Endothelzellen Hypoxie $0{,}5\%O_2$ nur zu einer 1,75 fachen Hochregulation der ADM mRNA Expression führte.

Wie in A7r5 AVSMC (4.1.2.1.) bewirkte auch Deferoxamin im Vergleich zu den anderen beiden Versuchsbedingungen in Endothelzellen den größten Anstieg der ADM mRNA Expression (3 fach). In den Primärkulturen von Mesangialzellen war Deferoxamin ebenfalls ein effizienter Stimulator der ADM Genexpression (8 fach), hingegen steigerte DFX in Primärkulturen von Hepatozyten die ADM mRNA nur um den Faktor 1,5.

Auch $CoCl_2$ steigerte die ADM mRNA in Mesangialzellen (9 fach) und in Hepatozyten (3 fach), hingegen wurde durch $CoCl_2$ in den Endothelzellen die ADM mRNA Expression im Vergleich zum Kontrollniveau nicht verändert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass auch auf zellulärer Ebene, wie im Gesamtorgan, die ADM Genexpression durch Hypoxie aktiviert wird, wobei die Stärke der Induktion der ADM Genexpression vom Zelltyp und von der Art des Hypoxiestimulus abhängig ist.

4.2. Einfluss von Zytokinen auf das ADM System

Hypoxie führt zu einer Änderung von Redoxpotentialen. Diese veränderten Redoxpotentiale werden hauptsächlich für die Steuerung der Genexpression von sauerstoffregulierten Genen verantwortlich gemacht (Zhu et al. 1999). Auch Zytokine, die unter anderem in der Zelle eine vermehrte Synthese des Enzyms iNOS auslösen, das zu einem Anstieg des radikalischen NO-Moleküls führt (Chester et al. 1998, Bonmann et al. 1997), können Redoxpotentiale ändern (Padgett et al. 1995, Goss et al. 1999, Gow et al. 2001). Zudem konnte bisher bei einer Reihe von sauerstoffregulierten Genen wie EPO und VEGF (Vascular endothelial growth factor) gezeigt werden, dass Zytokine deren Genexpression beeinflussen können (Faquin et al. 1992).
Es gibt bereits erste Befunde, die für eine Beteiligung des ADM Genes an Entzündungsvorgängen sprechen. So führten bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), die inflammatorische Zytokine induzieren können, zu einer Aktivierung des Adrenomedullingenes sowohl im Blutplasma als auch in verschiedenen Organen der Ratte (Shoji et al. 1995). Ebenso wurde die ADM Genexpression durch LPS in Zellkulturen von Makrophagen (Zaks-Zilberman et al. 1998) und Fibroblasten (Isumi et al. 1998) induziert. Dies lässt den Schluss zu, dass möglicherweise das ADM Gen außer durch Hypoxie auch noch durch inflammatorische Vorgänge induziert werden könnte. Daher wurde versucht, die Einflüsse von Zytokinen auf das ADM System näher zu untersuchen.
Aus der Vielzahl von Zytokinen wurden für die Versuche der Tumor Nekrose Faktor alpha (TNFα), Interleukin 1beta (Il-1ß) und Interferon gamma (IFNγ) ausgewählt, da diese Zytokine wesentlich an entzündlichen Vorgängen beteiligt sind (Kox et al. 2000). Die Untersuchung erfolgte vor allem an A7r5 AVSMC. Die Zytokine TNFα, Il-1ß und IFNγ wurden einzeln, in drei 2er Kombinationen und in Form einer Dreierkombination, die als „Zytokin-(3)-kombination“ bezeichnet wurde, zu den Zellkulturen zugegeben.

4.2.1. Einfluss der Zytokin-(3)-kombination auf die Genexpression in A7r5 AVSMC

4.2.1.1. Einfluss der Zytokin-(3)-kombination auf die ADM mRNA Expression in A7r5 AVSMC

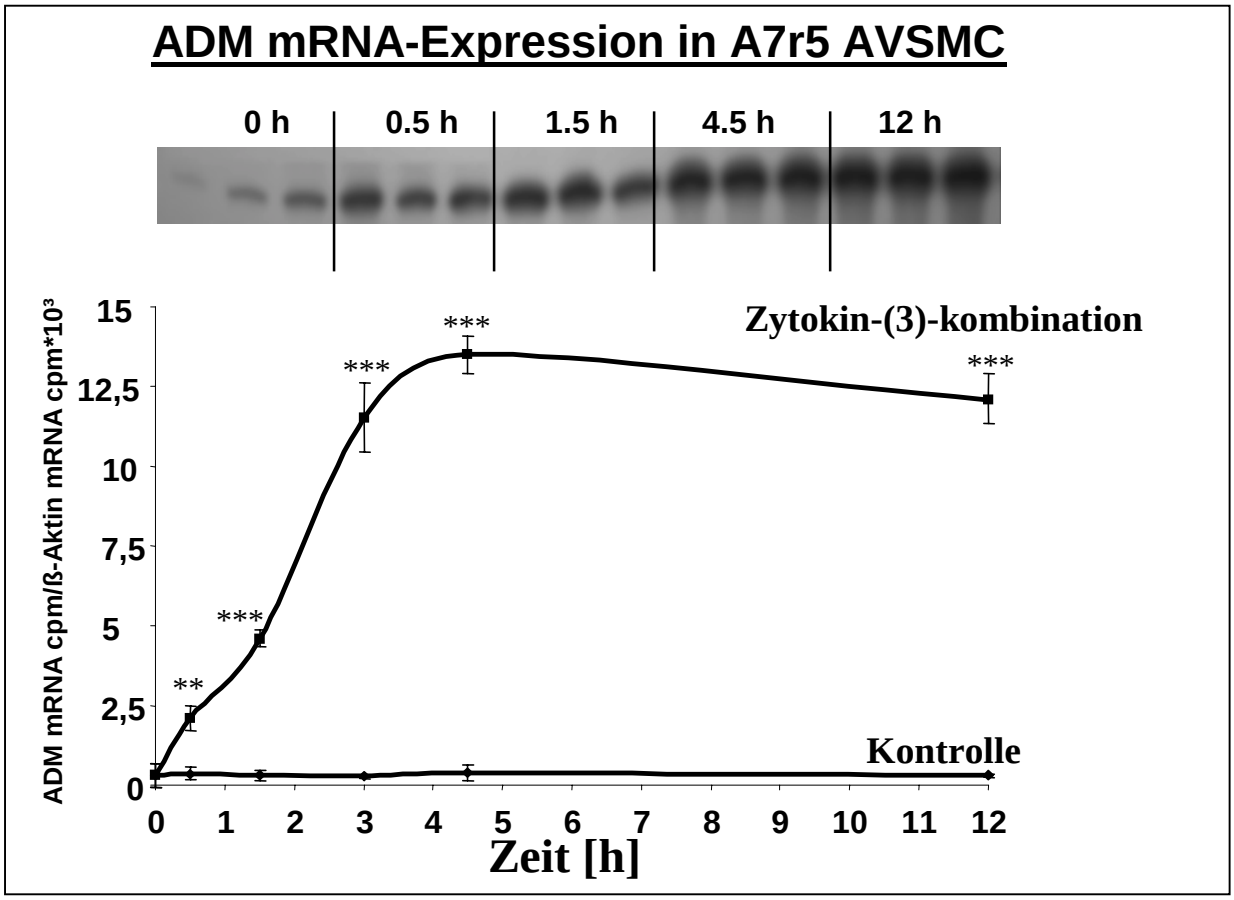

Abbildung 15: A7r5 AVSMC wurden mit der Zytokin-(3)-kombination bestehend aus den inflammatorischen Zytokinen TNFα (100µg/L), Il-1ß (20µg/L) und IFNγ (0,5U/L) für 0,5h, 1,5h, 3h, 4,5h und 12h inkubiert. Der obere Teil der Abbildung zeigt ein Autoradiogramm eines RNase Protection Assays für ADM mRNA [Geschützte ADM cRNA Fragmente wurden durch Hybridisierung mit 20µg Total RNA von A7r5 AVSMC gebildet, die mit der Zytokin-(3)-kombination für 0,5h, 1,5h, 4,5h und 12h behandelt wurden]. Der untere Teil der Abbildung zeigt die ADM mRNA Expression von A7r5 AVSMC ohne (=Kontrolle) und mit Zytokinbehandlung. Die Werte für die ADM mRNA Expression wurden auf die ß-Aktin mRNA bezogen, mit dem Faktor 1000 multipliziert und stellen Mittelwerte ± SEM aus 6 Einzelwerten dar (n=6) (**P<0,01 vs. Kontrolle; ***P<0,001 vs. Kontrolle).

Die Kombination der inflammatorischen Zytokine TNFα , Il-1ß und IFNγ führte in A7r5 AVSMC zu einer zeitabhängigen Stimulation der ADM mRNA (Abb.15). Bereits nach 0,5h wurde die ADM mRNA Expression durch die Zytokin-(3)-kombination induziert (4 fach), wobei die ADM mRNA Expression nach dem Expressionsmaximum bei 4,5h (26 fach) in ein Plateau überging und nach 12h noch 23 fach über dem Kontrollniveau lag.

4.2.1.2. Einfluss der Zytokin-(3)-kombination auf die iNOS mRNA Genexpression in A7r5 AVSMC

Die iNOS Genexpression wird durch inflammatorische Zytokine aktiviert. (Wong et al. 1995). Daher wurde die iNOS mRNA in den A7r5 AVSMC, die mit der Zytokin-(3)-kombination behandelt wurden, zu verschiedenen Zeitpunkten mit Hilfe des RNase Protection Assays bestimmt, um dadurch einen zeitlichen Zusammenhang der iNOS Genexpression (Abb. 16) und der ADM Genexpression (Abb. 15) zu erhalten.

Die basale iNOS mRNA Expression lag unter der Nachweisgrenze (Kontrolle, Abb.16). Die Zytokin-(3)-kombination führte jedoch nach 1,5h zu einer nachweisbaren Steigerung der iNOS mRNA Expression, die nach einem starken Anstieg bis 4,5h in ein Plateau überging.

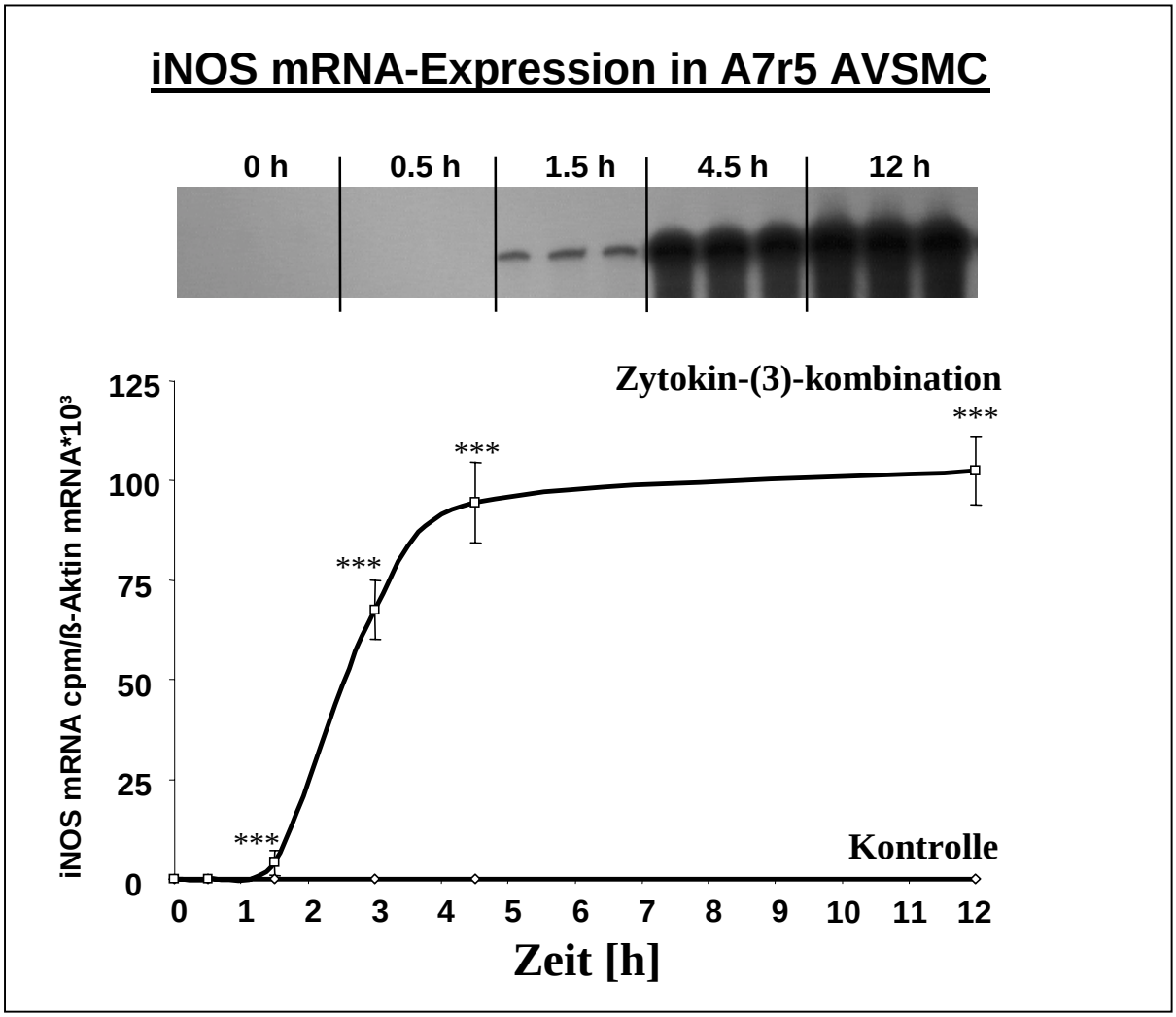

Abbildung 16: A7r5 AVSMC wurden mit der Zytokin-(3)-kombination bestehend aus den inflammatorischen Zytokinen TNFα (100µg/L), Il-1ß (20µg/L) und IFNγ (0,5U/L) für 0,5h, 1,5h, 3h, 4,5h und 12h inkubiert. Der obere Teil der Abbildung zeigt ein Autoradiogramm eines RNase Protection Assays für iNOS mRNA [Geschützte iNOS cRNA Fragmente wurden durch Hybridisierung mit 20µg Total RNA von A7r5 AVSMC gebildet, die mit der Zytokin-(3)-kombination für 0,5h, 1,5h, 4,5h und 12h behandelt wurden]. Der untere Teil der Abbildung zeigt die iNOS mRNA Expression von A7r5 AVSMC ohne (=Kontrolle) und mit Zytokin-(3)-kombination. Die Werte für die iNOS mRNA Expression wurden auf die ß-Aktin mRNA bezogen, mit dem Faktor 1000 multipliziert und stellen Mittelwerte ± SEM aus 6 Einzelwerten dar (n=6) (***P<0,001 vs. Kontrolle).

4.2.1.3. Einfluss des NOS Inhibitors L-NAME auf die durch die Zytokin-(3)-kombination induzierte ADM mRNA Expression in A7r5 AVSMC

Wie in Abb. 15 und 16 dargestellt, wurde die ADM und iNOS mRNA unter dem Einfluss von Zytokinen stark induziert. Die Induktion der ADM Genexpression und der iNOS

Genexpression erfolgte parallel. Inwiefern NO, das in der Zelle durch NO Synthasen gebildet werden kann, die ADM Genexpression beeinflusste, wurde durch eine Hemmung der NO Synthese mit dem NOS Inhibitor L-NAME [L-Nitrosoaminomethylester (1mmol/L)] untersucht.

Wie die Abb. 17 zeigt, wurde die durch die Zytokin-(3)-kombination induzierte ADM mRNA Expression unter dem NOS Inhibitor L-NAME stark vermindert. Bereits nach 1,5h war die Zytokin-induzierte ADM mRNA Abundanz unter L-NAME um 40%, nach 3h um 70%, nach 4,5h um 85% und nach 12h um 75% reduziert.

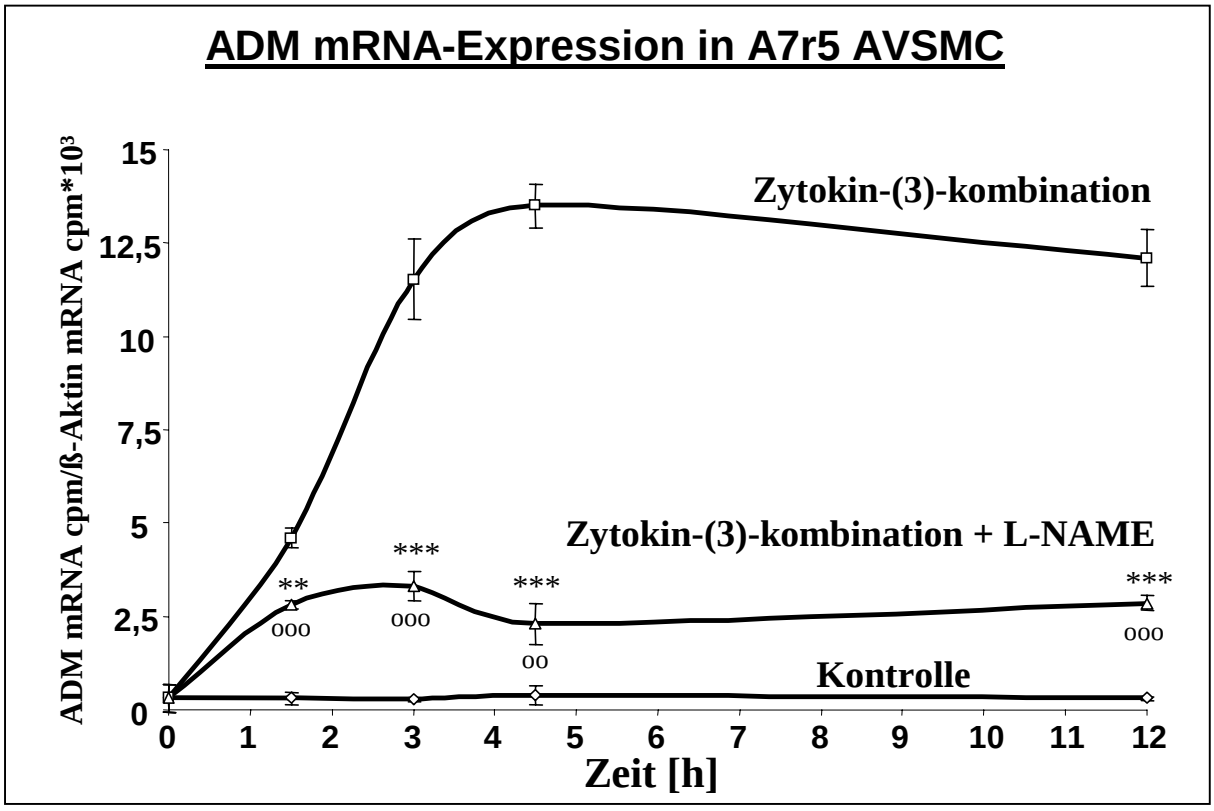

Abbildung 17: A7r5 AVSMC wurden mit der Zytokin-(3)-kombination bestehend aus den inflammatorischen Zytokinen TNFα (100µg/L), Il-1ß (20µg/L) und IFNγ (0,5U/L) für 1,5h, 3h, 4,5h und 12h ohne bzw. mit dem NOS Inhibitor L-NAME (1mmol/L) inkubiert. Die Kontrollen waren unbehandelt. Die Werte für die ADM mRNA Expression wurden auf die ß-Aktin mRNA bezogen, mit dem Faktor 1000 multipliziert und stellen Mittelwerte ± SEM aus 6 Einzelwerten dar (n=6) (^{oo}P<0,01 vs. Kontrolle; ^{ooo}P<0,001 vs. Kontrolle; **P<0,01 vs. Zytokin-(3)-kombination; ***p<0,001 vs. Zytokin-(3)-kombination).

4.2.1.4. Einfluss von NO auf die ADM mRNA Expression in A7r5 AVSMC

Wie aus der Abb. 17 hervorgeht, wurde die Zytokin-induzierte ADM mRNA Expression durch den NOS Inhibitor L-NAME in A7r5 AVSMC gehemmt. Der Zeitverlauf der iNOS mRNA Expression änderte sich jedoch nicht [Daten nicht gezeigt].

Da die ADM mRNA Expression durch die Hemmung der NO Produktion stark vermindert wurde, sollte die kausale Rolle von Stickstoffmonoxid bei der ADM Genexpression durch Zugabe von NO Donoren untersucht werden. Die Abb. 18 bzw. 19 zeigen den zeitabhängigen bzw. konzentrationsabhängigen Verlauf der ADM mRNA Expression unter der Wirkung der NO Donoren SNAP [(±)-S-Nitroso-N-acetylpenicillamin] und DETA NONOate [(Z)-1-(2-Aminoethyl)-N-[(2-ammonioethyl) amino]diazen-1-ium-1,2-diolate].

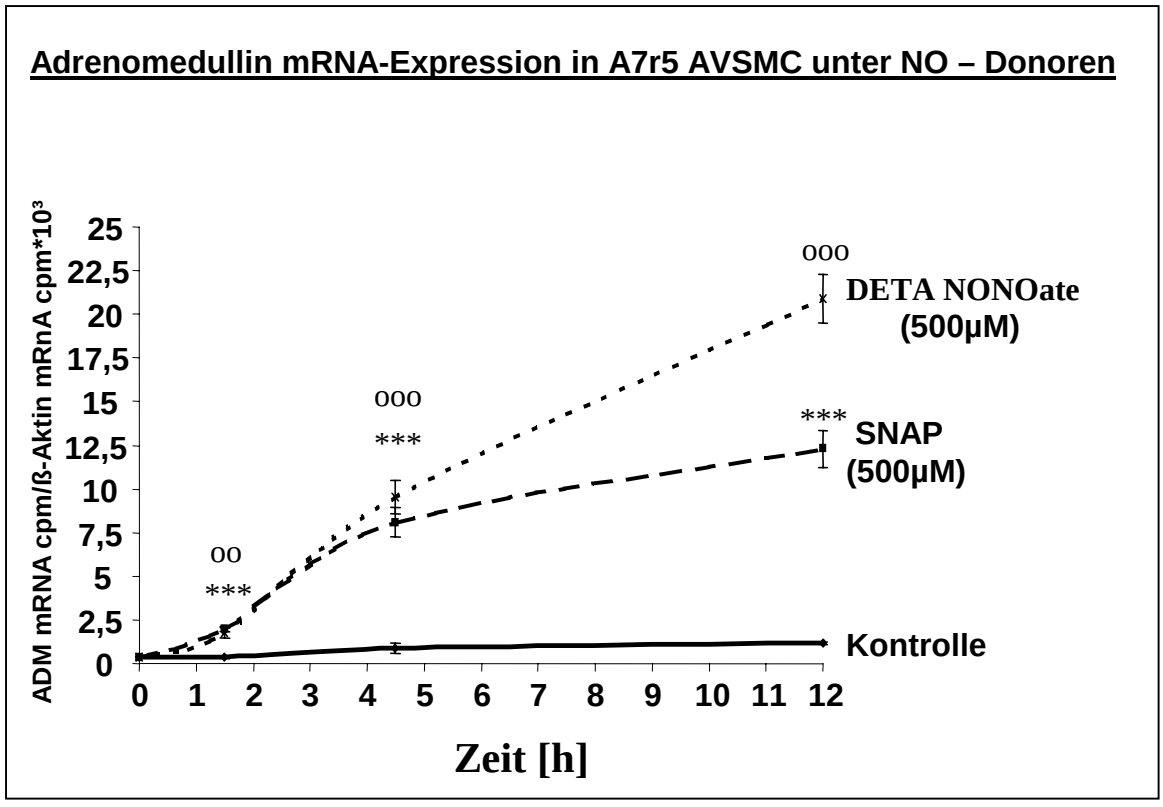

Abbildung 18: A7r5 AVSMC wurden mit den NO Donoren SNAP (500µmol/L) und DETA NONOate (500µmol/L) für 1,5h, 4,5h und 12h inkubiert. Kontrollen wurden nicht behandelt. Die Werte für die ADM mRNA Expression wurden auf die ß-Aktin bezogen, mit dem Faktor 1000 multipliziert und stellen Mittelwerte ± SEM aus 6 Einzelwerten dar (n=6) (***P<0,001 vs. Kontrolle; ^{oo}P<0,01 vs. Kontrolle; ^{ooo}P<0,001 vs. Kontolle).

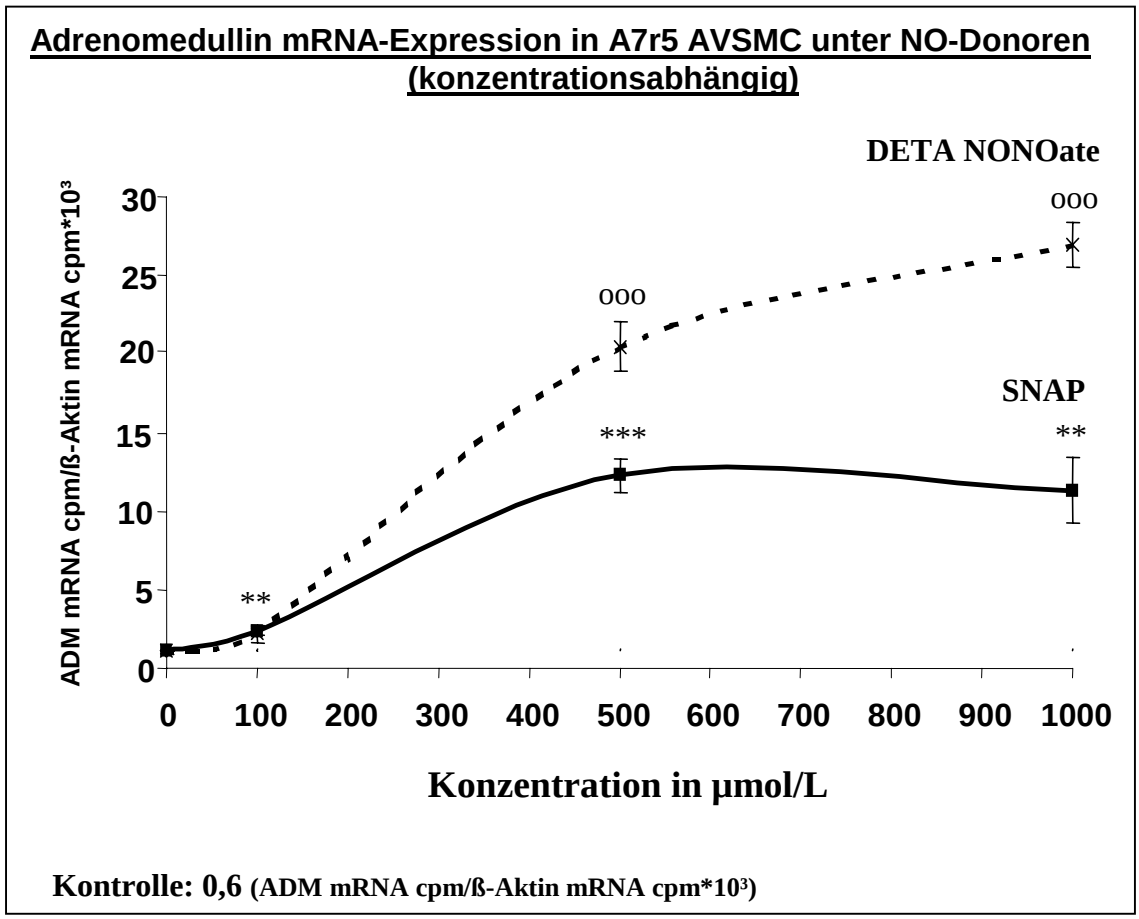

Abbildung 19: A7r5 AVSMC wurden mit den NO Donoren SNAP und DETA NONOate in den Konzentrationen 100, 500 und 1000µmol/L für 12h inkubiert. Kontrollen wurden nicht behandelt. Die Werte für die ADM mRNA Expression wurden auf die ß-Aktin mRNA bezogen, mit dem Faktor 1000 multipliziert und stellen Mittelwerte ± SEM aus 6 Einzelwerten dar (n=6) (**P<0,01 vs. Kontrolle; ***P<0,001 vs. Kontrolle; ^{ooo}P<0,001 vs. Kontrolle)

Die ADM mRNA Expression in A7r5 AVSMC wurde durch die beiden NO Donoren SNAP und DETA NONOate [jeweils in der Konzentration 500µmol/L] im Vergleich zur Kontrolle deutlich induziert. Bereits nach 1,5h führten die NO Donoren SNAP und DETA NONOate zu einer Erhöhung (3,5 fach) der ADM mRNA Abundanz, die bis zum Zeitpunkt 12h nochmals stark zunahm. Der NO Donor DETA NONOate, der eine doppelt so lange Halbwertszeit als SNAP aufweist, induzierte nach 12h die ADM mRNA Expression stärker als SNAP.

Auch wurde die Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen der NO Donoren SNAP und DETA NONOate auf die ADM mRNA Expression nach 12stündiger Inkubation bestimmt. Schon 100µmol/L der beiden NO Donoren steigerten die ADM mRNA Expression um den

Faktor 3. Der NO Donor SNAP in der Konzentration von 1000µmol/L konnte die ADM mRNA Expression nicht über das bei 500µmol/L gemessene Niveau hinaus erhöhen. Jedoch bewirkte 1000µmol/L DETA NONOate eine noch höhere ADM mRNA Expression als 500µmol/L. Wie schon die Abb. 18 zeigte, war DETA NONOate wieder die wirksamere Substanz (Abb. 19).

4.2.1.5. Einfluss von NO auf die ADM mRNA Expression in weiteren Zelltypen

Wie in den Abbildungen 18 und 19 dargestellt, wurde die Adrenomedullin-Genexpression in A7r5 AVSMC durch NO induziert. Nun könnte es aber sein, dass A7r5 AVSMC, die als glatte Gefäßmuskelzellen im Gefäß in direkten Kontakt mit den NO bildenden Endothelzellen stehen, in einer besonderen Art und Weise durch NO beeinflussbar sind. Um eine mögliche zelltypspezifische Reaktion der A7r5 AVSMC auf die ADM Genexpression auszuschließen, wurde die Wirkung von NO auf die ADM mRNA Expression auch in anderen Zelltypen untersucht. Hierfür wurden Primärkulturen von Hepatozyten und glomerulären Mesangialzellen sowie die glomeruläre Endothelzelllinie (DSMZ, ACC 262) verwendet.

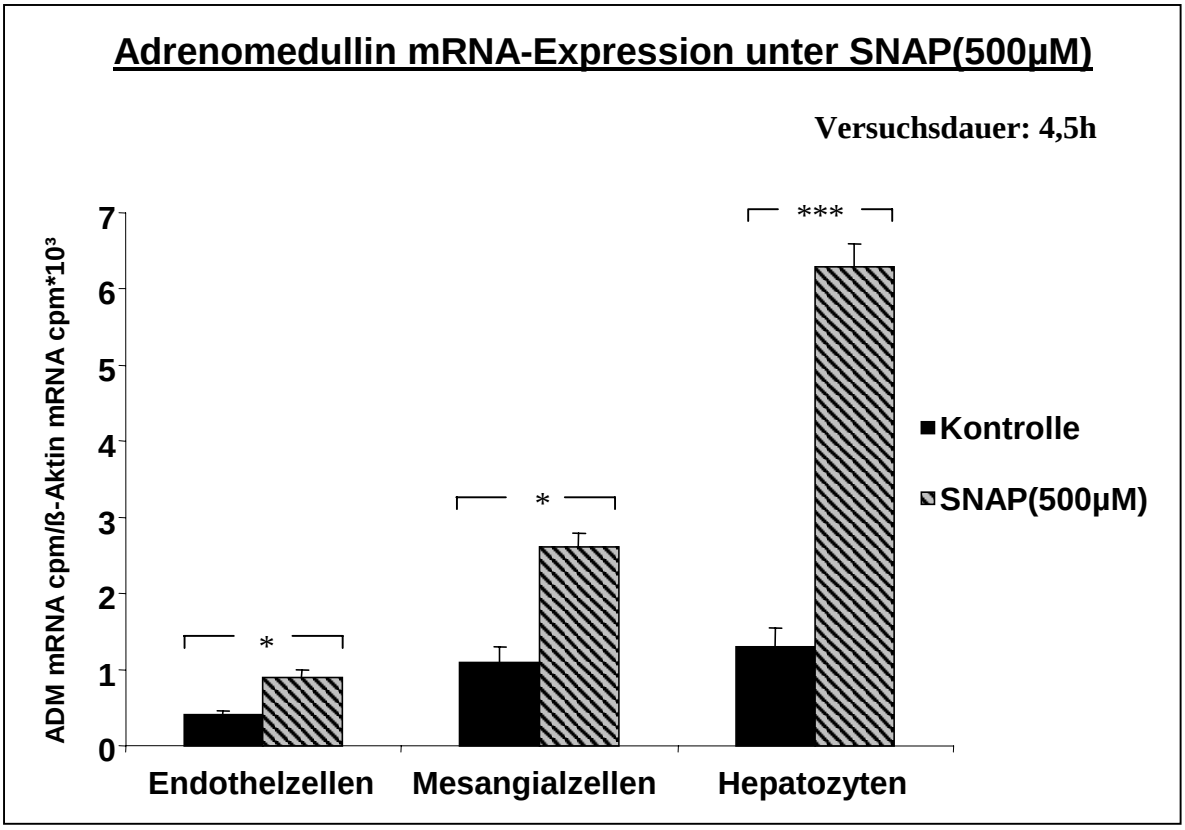

Abbildung 20: Primärkulturen von Hepatozyten und glomerulären Mesangialzellen bzw. glomeruläre Endothelzellen wurden mit dem NO Donor SNAP in der Konzentration 500 µmol/L für 4,5h inkubiert. Kontrollen waren unbehandelt. Die Werte für die ADM mRNA Expression wurden auf die ß-Aktin mRNA bezogen, mit dem Faktor 1000 multipliziert und stellen Mittelwerte ± SEM aus 6 Einzelwerten dar (n=6) (*P<0,05 vs. Kontrolle; ***P<0,001 vs. Kontrolle).

Die Abb. 20 zeigt die Wirkung von SNAP (500µmol/L) auf die drei untersuchten Zelltypen. In glomerulären Endothelzellen induzierte der NO Donor SNAP im Vergleich zur Kontrolle die ADM mRNA Expression nach 4,5h um den Faktor 2,2, in den Primärkulturen von Mesangialzellen um den Faktor 2,5 und in den Primärkulturen von Hepatozyten um den Faktor 4,5. Somit ist auch NO, wie schon vorher Hypoxie, in der Lage in unterschiedlichen Zelltypen das ADM Gen zu induzieren.

4.2.1.6. Messung von cGMP in A7r5 AVSMC

Nachdem auch in den anderen Zelltypen (vgl. 4.2.1.5.) das ADM Gen durch NO stimuliert wurde und somit sich Hinweise auf eine generelle Wirkung von NO auf die ADM Genexpression ergaben, wurde versucht, den Signalweg der NO vermittelten ADM Genexpression näher zu untersuchen. Dabei wurde der Guanylatcyclase (GC) abhängige Signaltransduktionsweg, einer der Hauptwege NO vermittelter Wirkungen (Pfeilschifter 2000), auf seine Beteiligung an der ADM Genexpression hin untersucht. Bei einer Aktivierung der GC durch die Zytokin-(3)-kombination bzw. durch die NO Donoren, würde mehr cGMP synthetisiert werden. Die cGMP Akkumulation wurde in A7r5 AVSMC dadurch bestimmt, dass der Abbau des gebildeten cGMPs durch den unspezifischen Phosphodiesteraseinhibitor IBMX (3-Isobutyl-methylxanthin) gehemmt wurde. Die in der Tabelle 4 gegenüber der Kontrolle erhöhten cGMP Spiegel zeigen, dass sowohl das NO der Zytokin-(3)-kombination als auch das der NO Donoren die Guanylatcyclase aktivierte.

Bedingungen	***C-GMP Werte in [pmol/ml]***	***Signifikanz P***
Kontrolle + IBMX	0,10 ± 0,05	
Zytokin-(3)-kombination + IBMX	1,92 ± 0,15	P<0,001
SNAP + IBMX	1,73 ± 0,2	P<0,001

Tabelle 4: A7r5 AVSMC wurden für 3h mit IBMX und der Zytokin-(3)-kombination bzw. SNAP behandelt. Kontrollen wurden nur mit IBMX behandelt. Die cGMP Werte sind in pmol/ml angegeben und stellen Mittelwerte ± SEM aus 6 Einzelwerten dar (n=6).

4.2.1.7. Einfluss von 8-Bromo-cGMP auf die ADM mRNA Expression in A7r5 AVSMC

Die Ergebnisse der cGMP Akkumulationmessung (4.2.1.6.) bestätigen, dass die GC durch NO in A7r5 AVSMC aktiviert wurde. Um eine mögliche Beteiligung der GC bzw. des cGMP an der NO induzierten ADM Genexpression zu zeigen, wurden die A7r5 AVSMC einerseits mit 8-Bromo-cGMP, einer wie cGMP wirkenden Substanz, andererseits mit ODQ (4.2.1.8.), einem spezifischen Inhibitor der Guanylatcyclase, inkubiert.

Abb. 21 zeigt, dass die ADM mRNA Expression durch 8-Bromo-cGMP nicht induziert wurde. Weder 100µmol/L noch 500µmol/L 8-Bromo-cGMP bewirkten eine Änderung der

ADM mRNA Expression. Dies ist ein erster Hinweis, dass die Induktion des ADM Genes nicht über cGMP und somit nicht durch die NO abhängige Induktion der GC erfolgt.

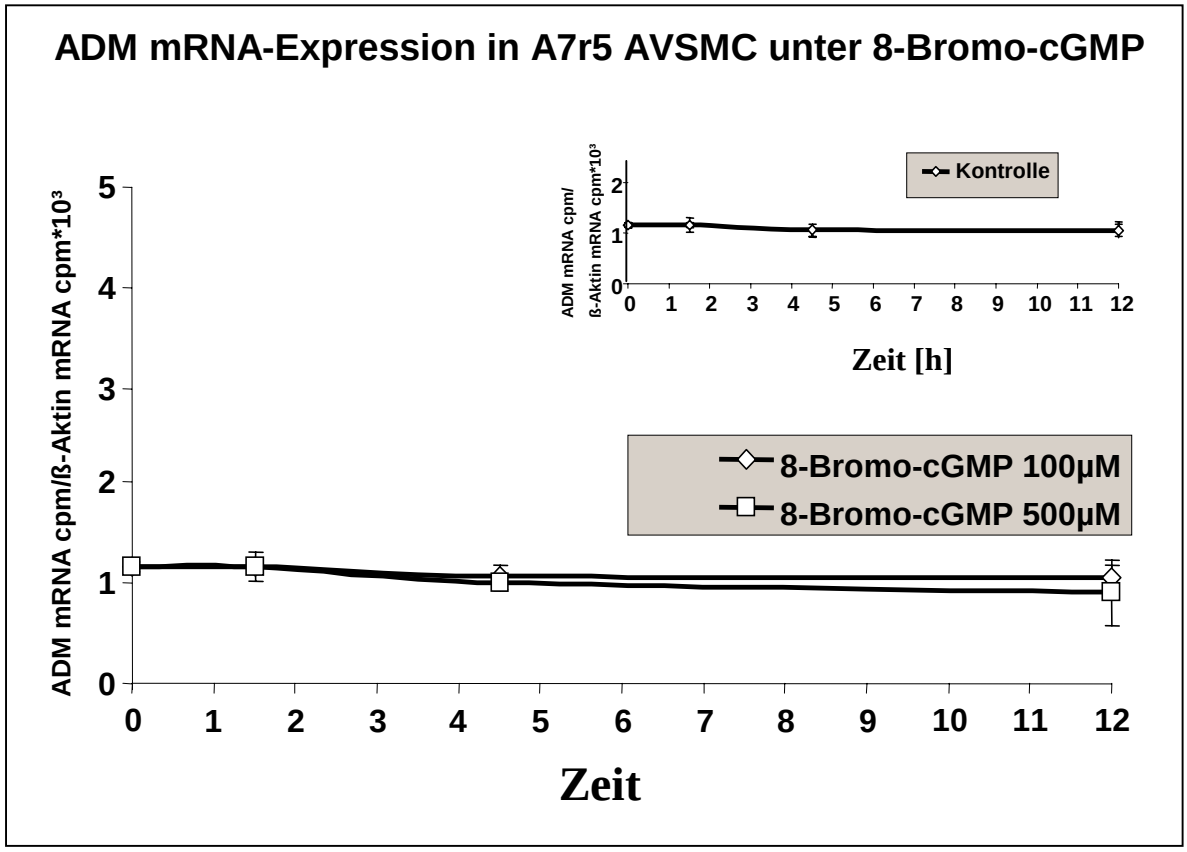

Abbildung 21: A7r5 AVSMC wurden mit 8-Bromo-cGMP in den Konzentrationen 100 und 500 µmol/L für 1,5h, 4,5h und 12h inkubiert. Die Kontrollen wurden in die Abb. 21 rechts oben integriert und wurden nicht behandelt. Die Werte für die ADM mRNA Expression wurden auf die ß-Aktin mRNA bezogen, mit dem Faktor 1000 multipliziert und stellen Mittelwerte ± SEM aus 6 Einzelwerten dar (n=6).

4.2.1.8. Einfluss von ODQ auf die ADM mRNA Expression in A7r5 AVSMC

Wie unter 4.2.1.7. erwähnt, kann auch durch Inhibierung der löslichen Guanylatcyclase und somit Blockade der cGMP Synthese überprüft werden, ob NO die ADM Genexpression über den GC - cGMP Weg induziert. Die Hemmung der löslichen GC in A7r5 AVSMC erfolgte dabei durch den spezifischen GC Inhibitor ODQ [1H-[1,2,4] Oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-one; (200µmol/L); (Zhao et al. 2000)]. Es zeigte sich, dass die ADM Genexpression der Kontrolle durch ODQ nicht beeinflusst wurde. Auch die ADM mRNA Expression der Zytokin-(3)-kombination sowie der NO Donoren wurde durch ODQ nicht verändert (Abb.

22). Dieser Befund bekräftigt wiederum die Hypothese, dass der GC - cGMP Signalweg nicht an der NO induzierten ADM Genexpression beteiligt ist.

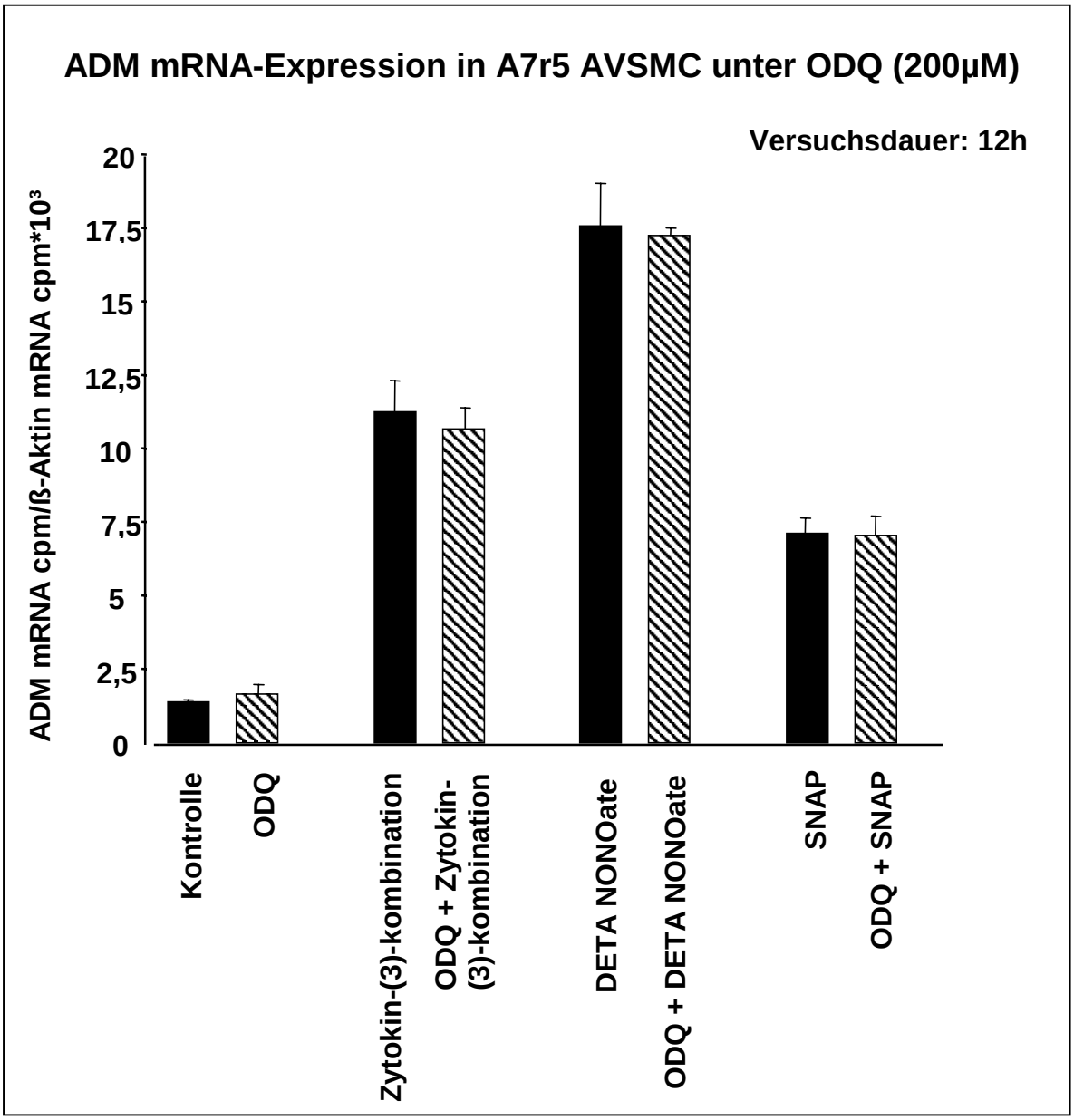

Abbildung 22: A7r5 AVSMC wurden mit der Zytokin-(3)-kombination bestehend aus den inflammatorischen Zytokinen TNFα (100µg/L), Il-1ß (20µg/L) und IFNγ (0,5U/L) bzw. den NO Donoren SNAP und DETA NONOate (je 500µmol/L) für 12h ohne bzw. mit dem Inhibitor der löslichen Guanylatcyclase ODQ (200µmol/L) inkubiert. Die Werte für die ADM mRNA Expression wurden auf ß-Aktin mRNA bezogen, mit dem Faktor 1000 multipliziert und stellen Mittelwerte ± SEM aus 6 Einzelwerten dar (n=6).

4.2.1.9. Einfluss der einzelnen Zytokine auf die ADM mRNA Expression in A7r5 AVSMC

Aus der ADM mRNA Expression der Zytokin-(3)-kombination war nicht ersichtlich, wie das ADM Gen durch jedes einzelne Zytokin beeinflusst wurde. Daher wurde die Einzelwirkung der Zytokine Tumor Nekrose Faktor alpha, Interleukin 1 beta oder Interferon gamma auf die ADM mRNA Expression in A7r5 AVSMC untersucht (Abb. 23-25).

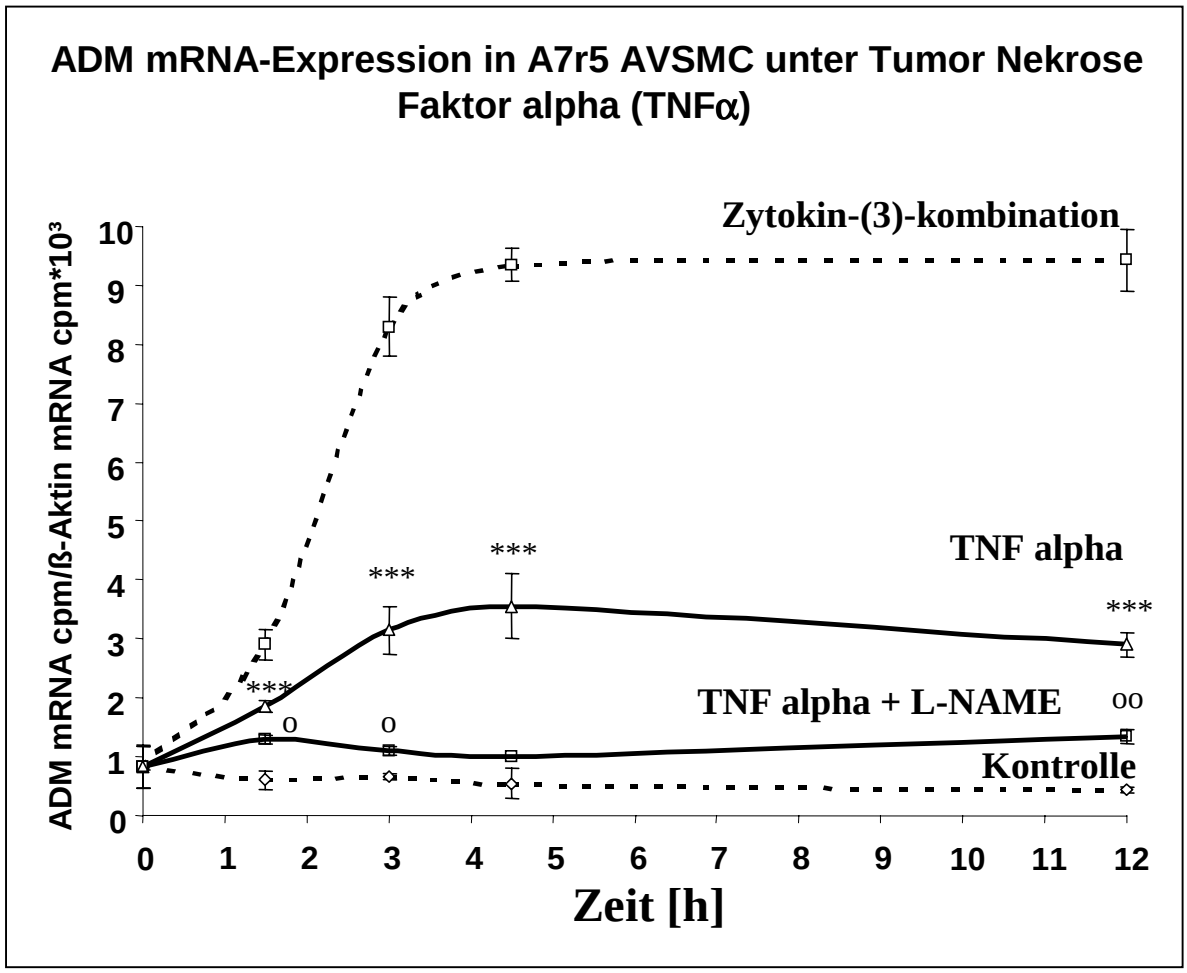

Abbildung 23: A7r5 AVSMC wurden mit der Zytokin-(3)-kombination [bestehend aus den inflammatorischen Zytokinen TNFα (100µg/L), Il-1ß (20µg/L) und IFNγ (0,5U/L)] oder mit TNFα (100µg/L) ohne und mit L-NAME (1mmol/L) für 1,5h, 3h, 4,5h und 12h inkubiert. Kontrollen wurden nicht behandelt. Die Werte für die ADM mRNA Expression wurden auf ß-Aktin mRNA bezogen, mit dem Faktor 1000 multipliziert und stellen Mittelwerte ± SEM aus 6 Einzelwerten dar (n=6) (^{o}P<0,05 vs. Kontrolle; ^{oo}P<0,01 vs. Kontrolle; ***P<0,001 vs. Kontrolle).

Die Abb. 23 zeigt, dass auch TNFα die ADM Genexpression in A7r5 AVSMC induzierte, wobei die ADM mRNA durch TNFα im Vergleich zur Zytokin-(3)-kombination schwächer exprimiert wurde. Auch durch den NOS Inhibitor L-NAME wurde die ADM mRNA Expression, die durch den Tumor Nekrose Faktor alpha induziert wurde, reduziert. Dabei wurde aber immer noch eine ADM mRNA Abundanz gefunden, die über der Kontrolle lag (Abb. 23).

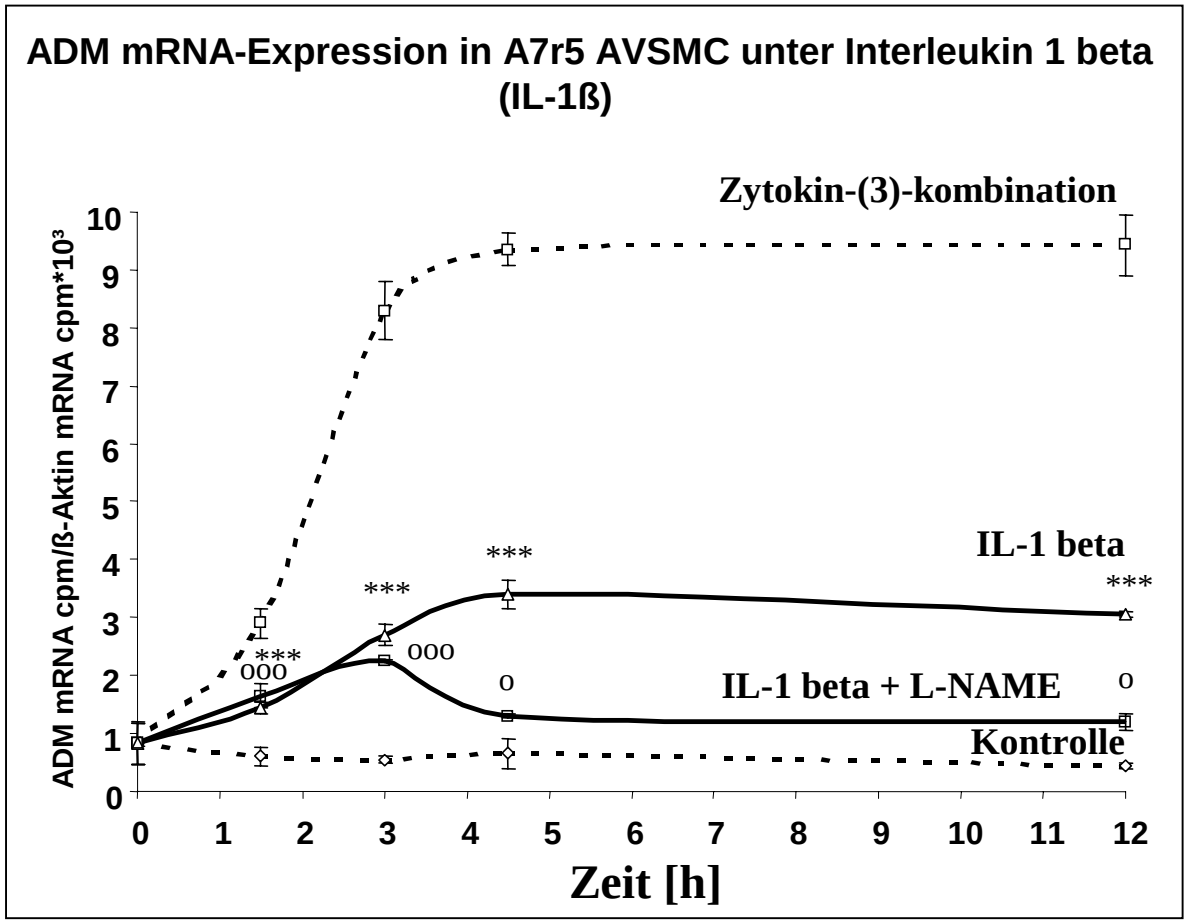

Abbildung 24: A7r5 AVSMC wurden mit der Zytokin-(3)-kombination [bestehend aus den inflammatorischen Zytokinen TNFα (100µg/L), Il-1ß (20µg/L) und IFNγ (0,5U/L)] oder mit IL-1ß (20µg/L) ohne und mit L-NAME (1mmol/L) für 1,5h, 3h, 4,5h und 12h inkubiert. Kontrollen wurden nicht behandelt. Die Werte für die ADM mRNA Expression wurden auf die ß-Aktin RNA bezogen, mit dem Faktor 1000 multipliziert und stellen Mittelwerte ± SEM aus 6 Einzelwerten dar (n=6) (^{o}P<0,05 vs. Kontrolle; ^{ooo}P<0,001 vs. Kontrolle; ***P<0,001 vs. Kontrolle).

Il-1ß bewirkte eine ähnlich starke Induktion der ADM Genexpression in A7r5 AVSMC wie TNFα. Auch unter dem NOS Inhibitor L-NAME wurde die ADM mRNA Expression, die durch Interleukin 1beta induziert wurde, vermindert. Dabei war aber, wie bei der Inkubation mit TNFα, die ADM mRNA Abundanz höher als die der Kontrolle (Abb. 24).

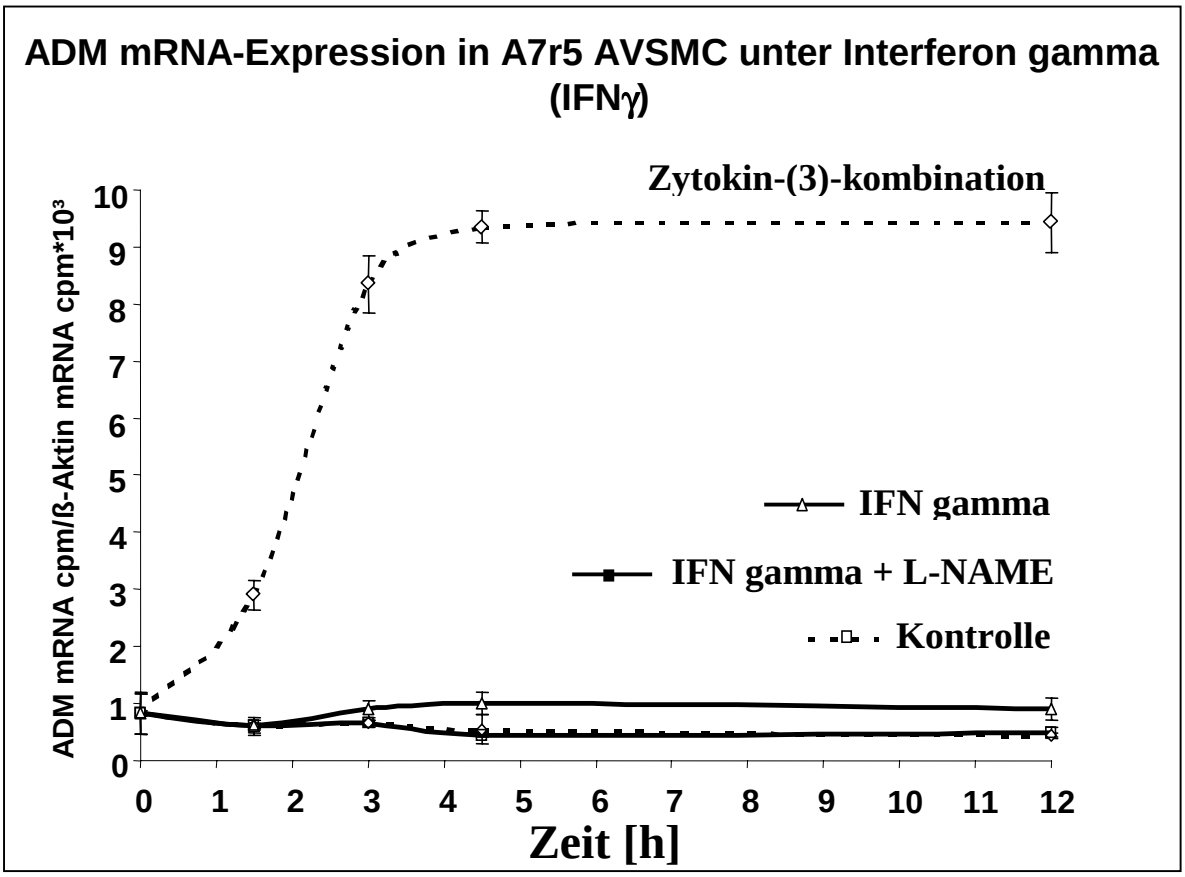

Abbildung 25: A7r5 AVSMC wurden mit der Zytokin-(3)-kombination [bestehend aus den inflammatorischen Zytokinen TNFα (100µg/L), Il-1ß (20µg/L) und IFNγ (0,5U/L)] oder mit IFNγ ohne und mit L-NAME (1mmol/L) für 1,5h, 3h, 4,5h und 12h inkubiert. Kontrollen waren unbehandelt. Die Werte für die ADM mRNA Expression wurden auf die ß-Aktin mRNA bezogen, mit dem Faktor 1000 multipliziert und stellen Mittelwerte ± SEM aus 6 Einzelwerten dar (n=6).

Die Inkubation der Zelllinie A7r5 AVSMC mit IFNγ führte im Vergleich zu TNFα bzw. Il-1ß zu einer ADM Genexpression, die nur gering über dem Kontrollniveau lag. IFNγ bewirkte im Gegensatz zu TNFα bzw. Il-1ß mit dem NOS Inhibitor L-NAME keine Änderung der ADM mRNA Expression gegenüber dem Kontrollniveau (Abb. 25).

Die Befunde zur Wirkung von TNFα, Il-1ß bzw. IFNγ auf die ADM Genexpression zeigten, dass TNFα bzw. Il-1ß die ADM mRNA Expression in ähnlicher Weise (etwa 4-fach) stimulierten, wohingegen IFNγ nahezu keine Änderung der ADM mRNA Abundanz im Vergleich zur Kontrolle bewirkte. Die Inhibierung der NO Synthese durch L-NAME führte bei TNFα bzw. Il-1ß zu einer verminderten Induktion der ADM mRNA (Abb. 23, 24), was wiederum die bedeutende Rolle des NO bei den Wirkungen der Zytokine zeigt.
Die Zytokin-(3)-kombination führte zu einer ADM mRNA Expression, die größer als die Summe der Einzeleffekte von Il-1ß, TNFα und IFNγ war, was darauf schließen lässt, dass ein synergistischer Wirkmechanismus dieser inflammatorischen Zytokine vorlag. Um diesen möglichen Synergismus näher zu charakterisieren, wurde die Wirkung von verschiedenen zweier Kombinationen der Zytokine TNFα, Il-1ß und IFNγ auf die ADM Genexpression untersucht (4.2.1.10.).

4.2.1.10. Einfluss von 2er Zytokinkombinationen auf die ADM mRNA Expression in A7r5 AVSMC

A7r5 AVSMC wurden für 12h mit 3 verschiedenen Zweierkombinationen der Zytokine TNFα, Il-1ß und IFNγ, nämlich I) TNFα + Il-1ß, II) Il-1ß + IFNγ und III) TNFα + IFNγ inkubiert.

Abbildung 26 zeigt, dass die ADM Genexpression durch die 2er Zytokinkombinationen schwächer als durch die Zytokin-(3)-kombination, aber stärker als durch die einzelnen Zytokine (Abb. 23-26) induziert wurde. Vergleicht man die Wirkung der Kombination Il-1ß + TNFα (8 fach) auf die ADM Genexpression mit der Wirkung von TNFα bzw. Il-1ß, so zeigt sich, dass der Effekt auf die ADM mRNA Expression in etwa additiv war. Trotzdem wurde die ADM mRNA Expression durch die Zytokin-(3)-kombination stärker induziert (etwa 12

fach) als durch die Kombination der Zytokine TNFα + Il-1ß (Abb. 26). Dies lässt auf eine synergistische Rolle des Zytokines IFNγ schließen. Tatsächlich wurde durch Zugabe von IFNγ zu TNFα bzw. Il-1ß die ADM mRNA Expression 6 fach bzw. 5 fach stimuliert, was signifikant stärker war als der Einzeleffekt der Zytokine TNFα bzw. Il-1ß auf die ADM mRNA Expression (Abb.26).

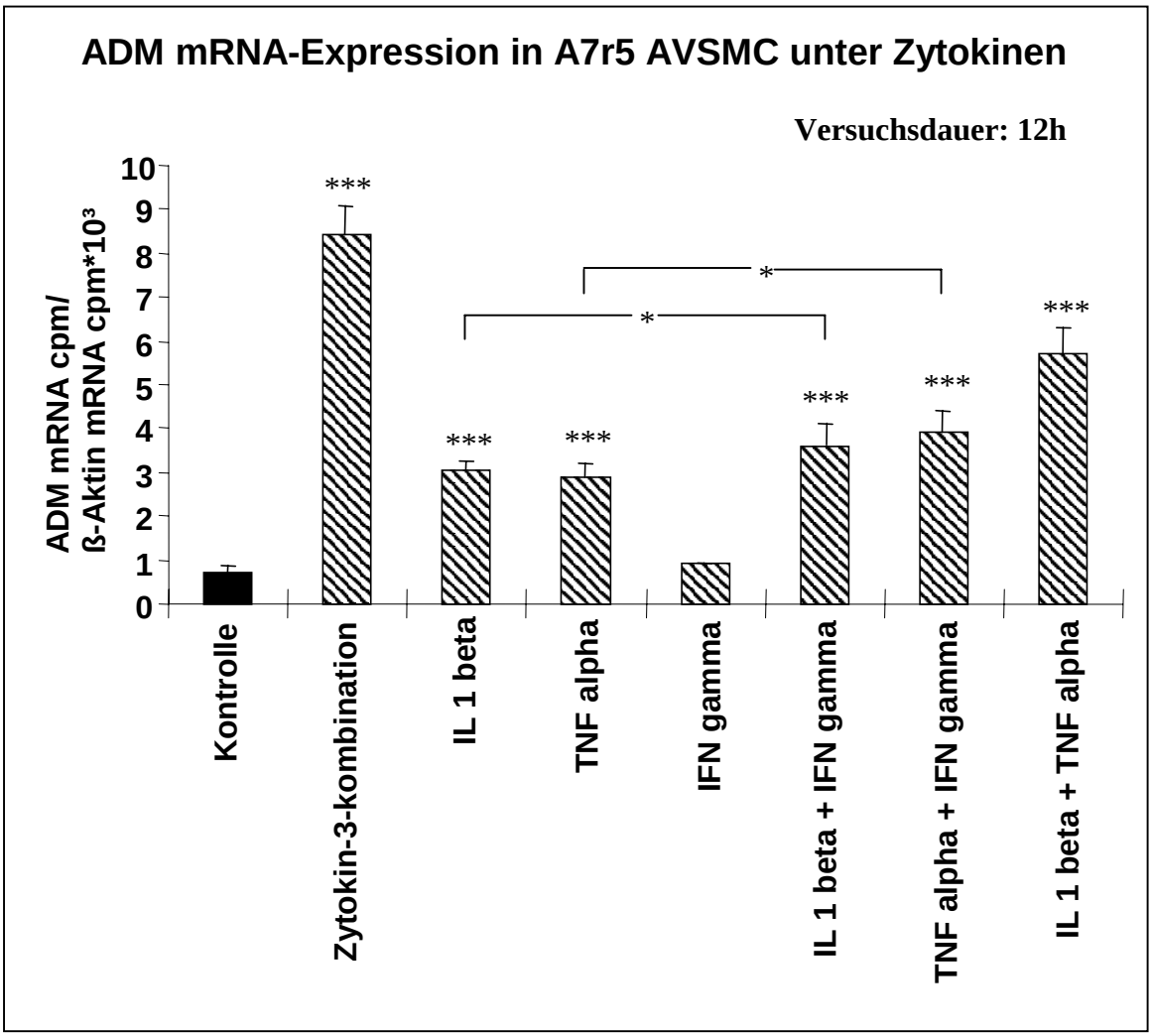

Abbildung 26: A7r5 AVSMC wurden mit der Zytokin-(3)-kombination [bestehend aus den inflammatorischen Zytokinen TNFα (100µg/L), Il-1ß (20µg/L) und IFNγ (0,5U/L)] oder mit den 2er Kombinationen TNFα (100µg/L) und IFNγ (0,5 U/L), Il-1ß (20µg/L) und IFNγ (0,5 U/L) bzw. TNFα (100µg/L) und Il-1ß (20µg/L) für 12h inkubiert. Kontrollen waren unbehandelt. Die Werte für die ADM mRNA Expression wurden auf ß-Aktin mRNA bezogen, mit dem Faktor 1000 multipliziert und stellen Mittelwerte ± SEM aus 6 Einzelwerten dar (n=6) (*P<0,05; ***P<0,001 vs. Kontrolle).

Zusammenfassung:

Die ADM Genexpression wurde in A7r5 AVSMC durch die Zytokine TNFα, Il-1ß und IFNγ in Form der Zytokin-(3)-kombination stark induziert. Die Wirkung der Zytokine auf die ADM Genexpression beruhte dabei größtenteils auf NO, dass von der iNOS synthetisiert wurde. Dies zeigten einerseits die Versuche mit dem NOS Inhibitor L-NAME, der die ADM mRNA Abundanz, die durch die Zytokin-(3)-kombination induziert wurde, deutlich verminderte. Andererseits steigerten die NO Donoren SNAP und DETA NONOate die ADM mRNA Expression. Die Befunde zur Wirkung von 8-Bromo-cGMP bzw. ODQ auf die ADM Genexpression zeigen, dass der Guanylatcyclase – cGMP Signaltransduktionsweg nicht an der Induktion des ADM Genes beteiligt ist. Die Untersuchung der Einzelwirkung der Zytokine TNFα, Il-1ß und IFNγ auf die ADM Genexpression zeigte, dass hauptsächlich die Zytokine TNFα und Il-1ß an der Induktion der ADM Genexpression beteiligt waren. Dem Zytokin IFNγ kam dabei mehr eine synergistische Rolle zu.

4.3. Gemeinsamer Einfluss von Hypoxie und Zytokinen auf die ADM mRNA Expression in A7r5 AVSMC

Wie Untersuchungen verschiedener Forschergruppen zeigen, können sauerstoffregulierte Gene, die durch Hypoxie aktiviert werden, durch NO bzw. Zytokine in ihrer Genexpression beeinflusst werden. So wurde die Erythropoietin (EPO) Genexpression sowohl in vivo (Todorov et al. 2000) als auch in vitro (Schobersberger et al.1996) durch NO gehemmt. Im Gegensatz dazu wurde die Vascular endothelial growth factor (VEGF) Genexpression durch NO erhöht (Kimura et al. 2000). Auch das Zytokin Il-1ß beeinflusste die VEGF Genexpression des Hypoxie-induzierten VEGF Genes (Awad et al. 2000). In Teil 4.3. der vorliegenden Arbeit wurden deshalb die Interaktionen von Hypoxie und Zytokinen (endogenes NO) bzw. NO Donoren (exogenes NO) auf die ADM mRNA Expression untersucht. Dazu wurden Hypoxie 0,5%O_2, Deferoxamin (100µmol/L) oder $CoCl_2$ (100µmol/L) entweder mit der Zytokin-(3)-kombination oder mit den NO Donoren SNAP bzw. DETA NONOate kombiniert. Anschliessend wurde die resultierende ADM mRNA Abundanz bestimmt.

4.3.1. Wirkung von Hypoxie und der Zytokin-(3)-kombination auf die ADM mRNA Expression in A7r5 AVSMC

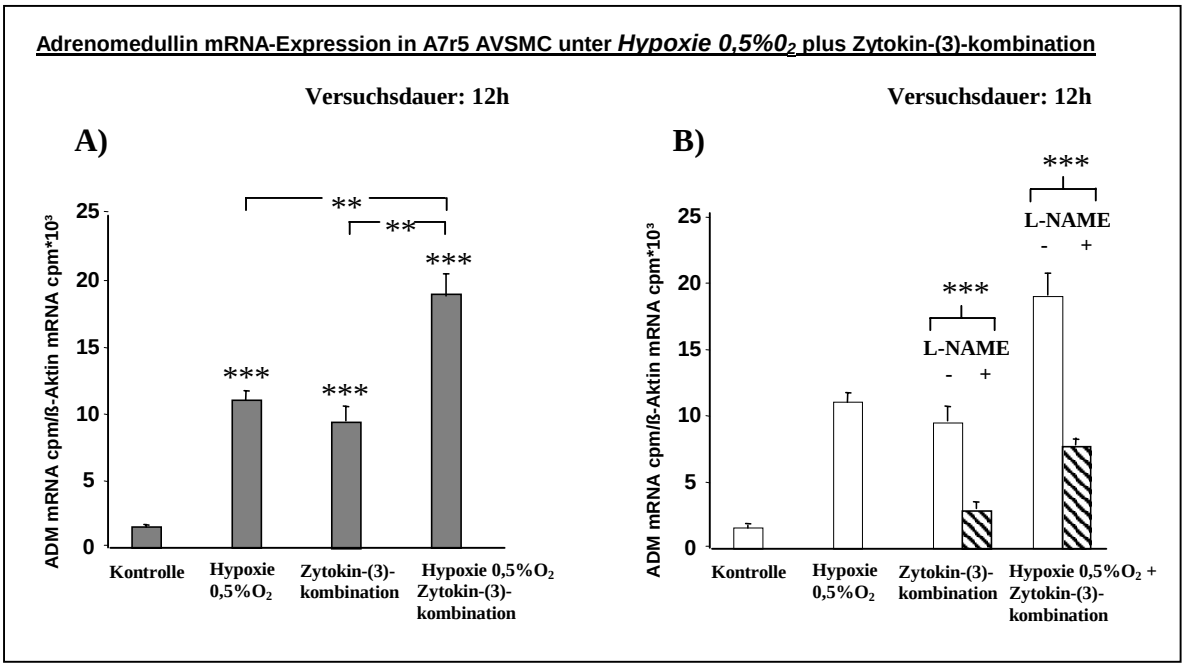

Abbildung 27: A7r5 AVSMC wurden mit Hypoxie 0,5%O_2 und/oder mit dem Zytokin-(3)-kombination bestehend aus den inflammatorischen Zytokinen TNFα (100µg/L), Il-1ß (20µg/L) und IFNγ (0,5U/L) für 12h ohne (A) bzw. mit (B) dem Inhibitor der NO Synthasen L-NAME (1mmol/L) inkubiert. Die Werte für die ADM mRNA Expression wurden auf ß-Aktin mRNA bezogen, mit dem Faktor 1000 multipliziert und stellen Mittelwerte ± SEM aus 6 Einzelwerten dar (n=6) (**P<0,01; ***P<0,001 vs. Kontrolle).

Hypoxie 0,5%O_2 führte in A7r5 AVSMC zu einer etwa 10 fachen Steigerung der ADM mRNA Abundanz. Die Kombination von Hypoxie 0,5%O_2 mit der Zytokin-(3)-kombination verstärkte die ADM mRNA Expression (18 fach im Vergleich zur Kontrolle) (Abb. 27 [Teil A]).

Durch die gleichzeitige Inkubation der Zytokin-(3)-kombination bzw. der Kombination Zytokin-(3)-kombination + Hypoxie 0,5%O_2 mit dem NO-Synthaseinhibitor L-NAME (1mmol/L) wurde die ADM mRNA Expression vermindert (Abb.27 [Teil B]).

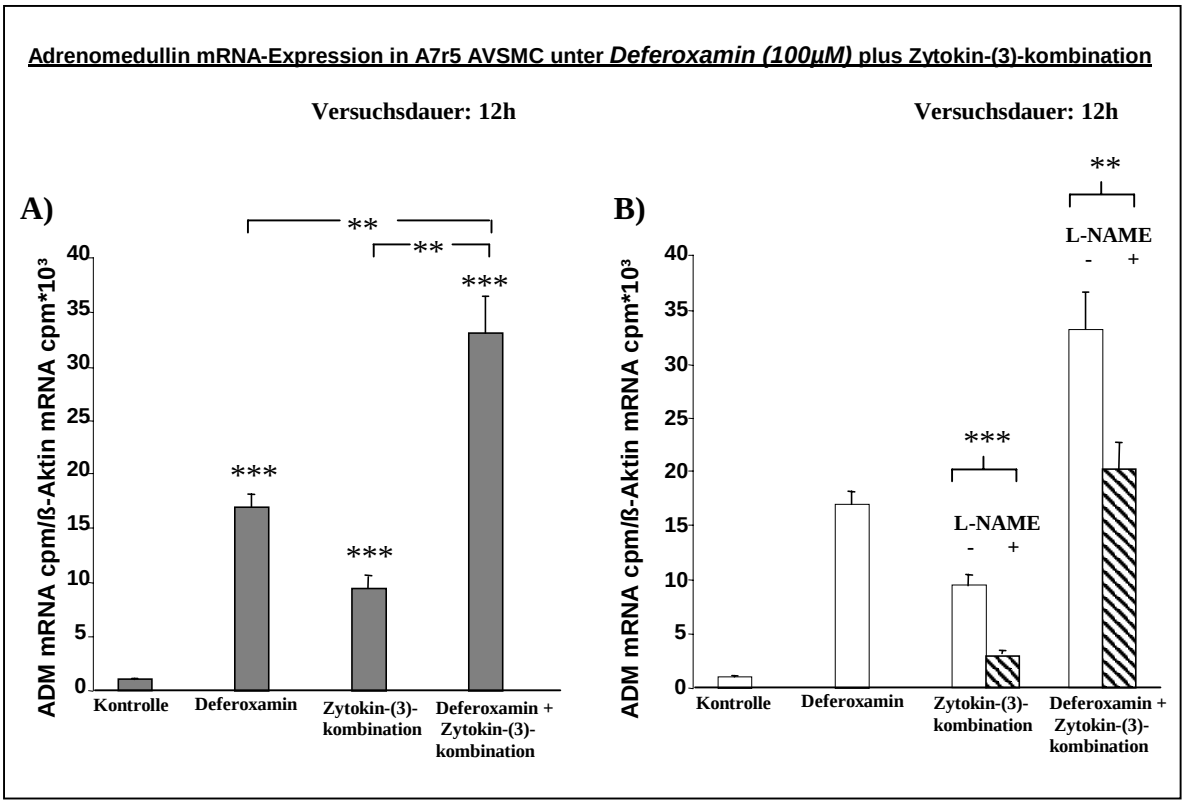

Abbildung 28: A7r5 AVSMC wurden mit Deferoxamin (100µmol/L) und/oder mit der Zytokin-(3)-kombination bestehend aus den inflammatorischen Zytokinen TNFα (100µg/L), Il-1ß (20µg/L) und IFNγ (0,5U/L) für 12h ohne (A) bzw. mit (B) dem Inhibitor der NO Synthasen L-NAME (1mmol/L) inkubiert. Die Werte für die ADM mRNA Expression wurden auf ß-Aktin mRNA bezogen, mit dem Faktor 1000 multipliziert und stellen Mittelwerte ± SEM aus 6 Einzelwerten dar (n=6) (**P<0,01; ***P<0,001 vs. Kontrolle).

Vergleichbar zur Hypoxie 0,5%O_2 wurde auch durch Deferoxamin (100µmol/L) in A7r5 AVSMC die ADM mRNA Abundanz im Vergleich zur Kontrolle erhöht (17 fach). Wiederum wurde durch die Kombination von Deferoxamin mit der Zytokin-(3)-kombination die ADM mRNA Expression stärker induziert (31 fach im Vergleich zur Kontrolle) als durch Deferoxamin bzw. durch die Zytokin-(3)-kombination (Abb. 28 [Teil A]).

Auch die gleichzeitige Inkubation der Zytokin-(3)-kombination bzw. der Kombination Zytokin-(3)-kombination + Deferoxamin mit dem NO-Synthaseinhibitor L-NAME (1mmol/L) verminderte die ADM mRNA Abundanz (Abb.28 [Teil B]), was auf eine NO-induzierte Wirkung hinweist.

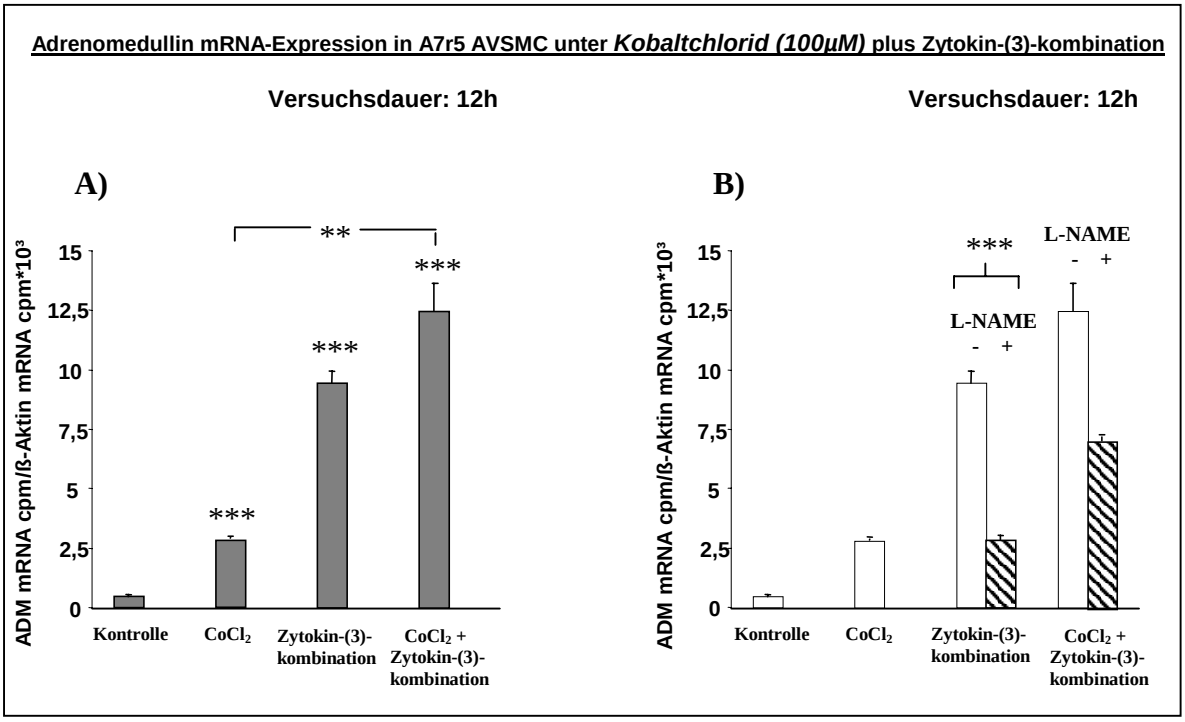

Abbildung 29: A7r5 AVSMC wurden mit Kobalt-II-chlorid (100µmol/L) und/oder mit der Zytokin-(3)-kombination bestehend aus den inflammatorischen Zytokinen TNFα (100µg/L), Il-1ß (20µg/L) und IFNγ (0,5U/L) für 12h ohne (A) bzw. mit (B) dem Inhibitor der NO Synthasen L-NAME (1mmol/L) inkubiert. Die Werte für die ADM mRNA Expression wurden auf ß-Aktin mRNA bezogen, mit dem Faktor 1000 multipliziert und stellen Mittelwerte ± SEM aus 6 Einzelwerten dar (n=6) (**P<0,01; ***P<0,001 vs. Kontrolle).

Auch Kobalt-II-chlorid (100µmol/L) induzierte die ADM Genexpression in A7r5 AVSMC (3 fach im Vergleich zur Kontrolle). Die Kombination von Kobalt-II-chlorid mit der Zytokin-(3)-kombination führte zu einer verstärkten ADM mRNA Expression (13 fach im Vergleich zur Kontrolle) (Abb. 29 [Teil A]).

Durch die gleichzeitige Inkubation der Zytokin-(3)-kombination bzw. der Kombination Zytokin-(3)-kombination + Kobalt-II-chlorid mit dem NO-Synthaseinhibitor L-NAME (1mmol/L) wurde wiederum die ADM mRNA Abundanz vermindert.(Abb.29 [Teil B]).

Zusammengefasst ergaben die Versuche (Abb. 27-29) ein ähnliches Bild. Die Zytokin-(3)-kombination hatte unter allen 3 hypoxischen Manövern eine additive Wirkung auf die ADM mRNA Expression. Der NOS-Inhibitor L-NAME verminderte die ADM mRNA Expression sowohl der Zytokin-(3)-kombination als auch der Kombination Hypoxieform (O_2-Mangel v. DFX v. $CoCl_2$) und Zytokin-(3)-kombination.

4.3.2. Wirkung von Hypoxie und NO Donoren auf die ADM mRNA Expression in A7r5 AVSMC

Die Hypoxie- und Zytokin-induzierte ADM mRNA Expression wurde durch die zusätzliche Inkubation der A7r5 AVSMC mit dem NOS Inhibitor L-NAME vermindert [Abbildungen 27-29 (4.3.1.)]. Um den Einfluss von NO unter den drei hypoxischen Manövern auf die ADM mRNA Expression zu untersuchen, wurde NO in Form der NO Donoren unter den oben genannten hypoxischen Bedingungen zu A7r5 AVSMC zugesetzt.

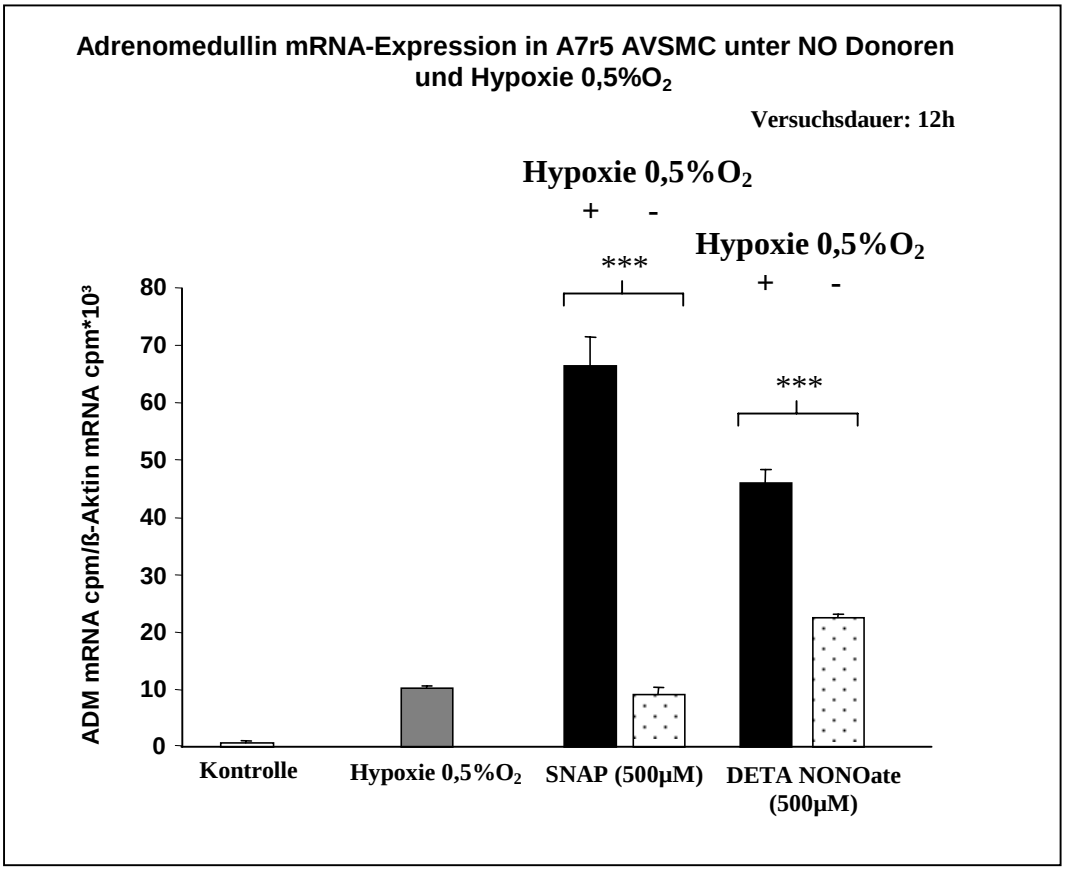

Abbildung 30: A7r5 AVSMC wurden mit Hypoxie (0,5%O_2) und SNAP bzw. DETA NONOate (schwarze Balken) oder den NO Donoren allein (gepunktete Balken) [NO Donorkonzentration je 500µmol/L] für 12h inkubiert. Kontrollen waren unbehandelt. Die Werte für die ADM mRNA Expression wurden auf die ß-Aktin mRNA bezogen, mit dem Faktor 1000 multipliziert und stellen Mittelwerte ± SEM aus 6 Einzelwerten dar (n=6) (***P<0,001).

Hypoxie 0,5%O_2 bzw. die NO Donoren SNAP und DETA NONOate führten im Vergleich zu den Kontrollen zu einer Erhöhung der ADM mRNA Expression [14 fach bzw. 13 fach und 32 fach]. Die Kombination von Hypoxie 0,5%O_2 mit SNAP bzw. DETA NONOate hatte einen überadditiven Effekt auf die ADM mRNA Expression (95 fach bzw. 65 fach). Diese Induktion lag deutlich über der jeweiligen ADM mRNA Expression, die sich aus der Addition der jeweiligen Einzeleffekte von Hypoxie 0,5%O_2 und SNAP bzw. DETA NONOate ergeben würde.

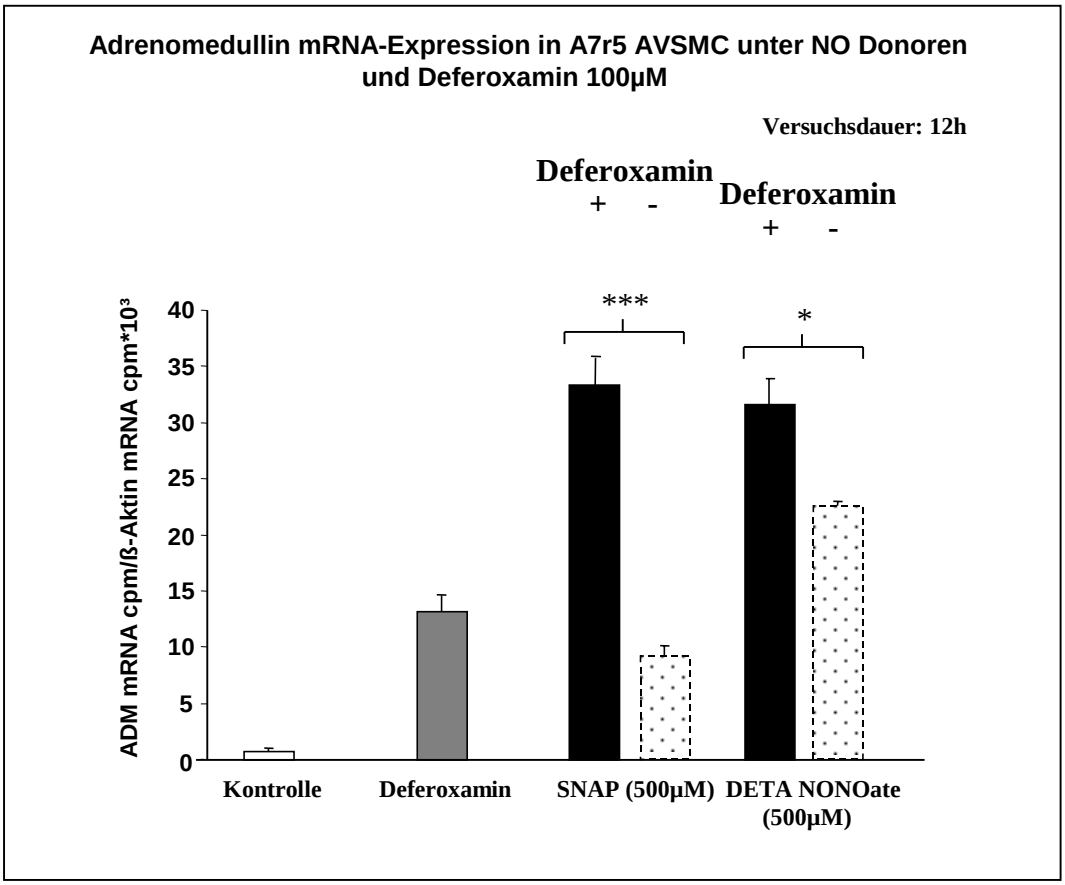

Abbildung 31: A7r5 AVSMC wurden mit Deferoxamin (100µmol/L) und SNAP bzw. DETA NONOate (schwarze Balken) oder den NO Donoren allein (gepunktete Balken) [NO Donorkonzentration je 500µmol/L] für 12h inkubiert. Kontrollen waren unbehandelt. Die Werte für die ADM mRNA Expression wurden auf die ß-Aktin mRNA bezogen, mit dem Faktor 1000 multipliziert und stellen Mittelwerte ± SEM aus 6 Einzelwerten dar (n=6) (*P<0,05; ***P<0,001).

Auch Deferoxamin induzierte die ADM mRNA Expression [19 fach vs. Kontrolle]. Die Kombination von Deferoxamin mit SNAP hatte ebenfalls eine überadditive Wirkung auf die

ADM mRNA Expression (48 fach). Auch hier war die ADM mRNA Expression, die durch die Kombination Deferoxamin und SNAP induziert wurde, höher als die ADM Genexpression, die sich aus der Addition der jeweiligen Einzeleffekte ergeben würde (32 fach). Die Stimulation der ADM mRNA Expression durch Deferoxamin in Kombination mit DETA NONOate (45 fach im Vergleich zur Kontrolle) erreichte hingegen die Summe der jeweiligen Einzeleffekte nicht (52 fach).

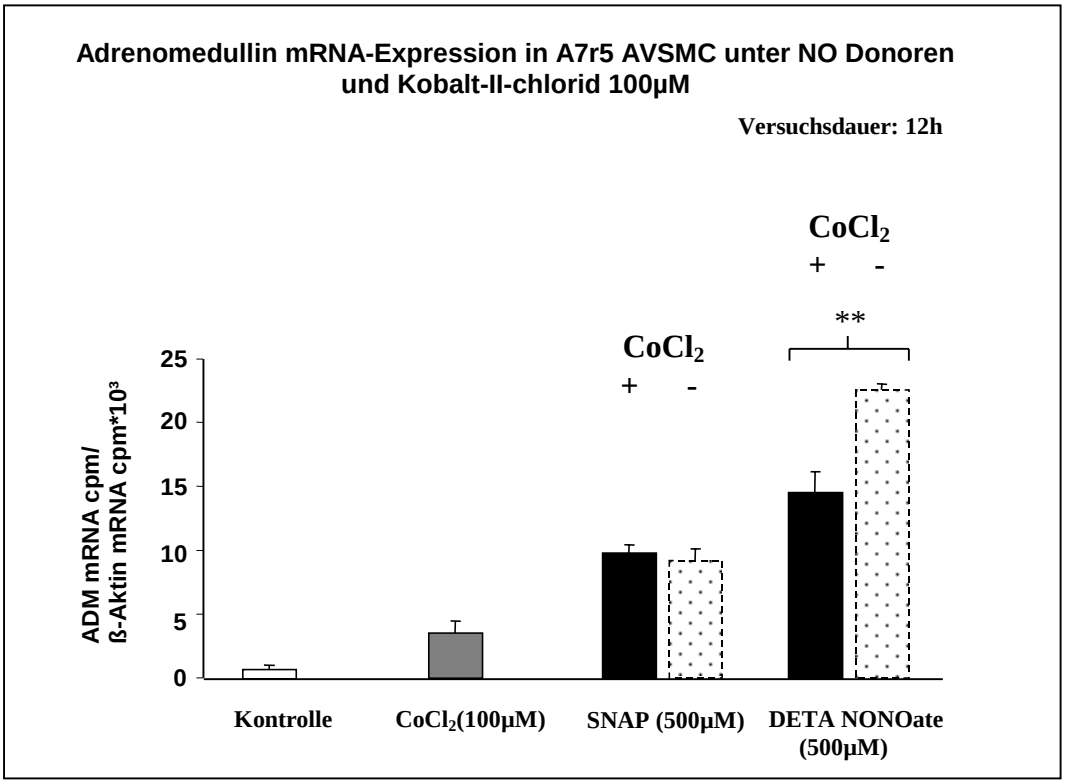

Abbildung 32: A7r5 AVSMC wurden mit Kobalt-II-chlorid (100µmol/L) und SNAP bzw. DETA NONOate (schwarze Balken) oder den NO Donoren allein (gepunktete Balken) [NO Donorkonzentration je 500µmol/L] für 12h inkubiert. Kontrollen waren unbehandelt. Die Werte für die ADM mRNA Expression wurden auf die ß-Aktin mRNA bezogen, mit dem Faktor 1000 multipliziert und stellen Mittelwerte ± SEM aus 6 Einzelwerten dar (n=6) (**P<0,01).

Die ADM mRNA Expression wurde auch durch $CoCl_2$ gegenüber der Kontrolle induziert [5 fach]. Die Kombination von $CoCl_2$ mit SNAP bzw. DETA NONOate steigerte die ADM mRNA Abundanz 14 fach bzw. 21 fach im Vergleich zur Kontrolle. Die ADM mRNA Expression, die durch die Kombination $CoCl_2$ und SNAP induziert wurde, lag nur geringfügig über der durch SNAP induzierten ADM Genexpression (13 fach im Vergleich zur Kontrolle).

Durch die Kombination $CoCl_2$ und DETA NONOate wurde die ADM mRNA sogar schwächer exprimiert als durch DETA NONOate alleine (21 fach gegenüber 33 fach im Vergleich zur Kontrolle).

Eine Zusammenfassung der Abb. 30-32 ergibt folgendes Bild. Zum einen hatte der NO Donor SNAP unter den 3 hypoxischen Manövern eine größere Wirkung auf die ADM Genexpression als DETA NONOate, was nicht mit den Befunden des Teils 4.2. korreliert. Zum anderen zeigten auch die einzelnen hypoxischen Manöver in Kombination mit den NO Donoren keinen einheitlichen Effekt auf die ADM mRNA Expression.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Einflüsse von Hypoxie und inflammatorischen Zytokinen auf die Genexpression von Adrenomedullin untersucht. So wurde zum einen die Hypothese überprüft, ob die Synthese und Freisetzung des ADM in vivo und in vitro vom Sauerstoffpartialdruck abhängig ist. Zum anderen wurde überprüft, ob und wie die ADM Genexpression durch inflammatorische Zytokine beeinflusst wird, und über welche intrazellulären Signaltransduktionswege Zytokine das ADM Gen induzieren könnten. Schließlich wurde noch der kombinierte Einfluss von Hypoxie und Zytokinen auf die ADM Genexpression untersucht.

5.1 Einfluss von Hypoxie auf das ADM System

5.1.1. Physiologische Verteilung von ADM und ADM-R mRNA bzw. ADM Protein unter Normoxie

Die ADM mRNA wurde in den Nebennieren, in der Lunge, in der Niere, im Herz, im Gehirn, in der Leber und in der Aorta der Ratte bestimmt. Alle diese Gewebe exprimierten ADM mRNA, wobei die gefundenen ADM mRNA Konzentrationen in den Organen unterschiedlich waren. Diese ubiquitäre Verteilung der ADM mRNA stimmt mit den Ergebnissen anderer Autoren überein [Hinson et al. 2000 (Review)] und weist auf eine bedeutende Rolle des Adrenomedullins für den Organismus hin, was sich auch durch Untersuchungen an Adrenomedullin knock-out Mäusen, die schon während der embryonalen Entwicklung sterben (Caron et al. 2001), bestätigte.

Die ADM-Rezeptor mRNA wurde in der Lunge und in der Nebenniere am stärksten exprimiert, eine schwächere ADM-R mRNA Grundexpression wurde in der Leber, in der Niere, im Gehirn sowie im Herz gemessen. Dieses Ergebnis bestätigt die Befunde von Kapas et al. (1995A) und Owji et al. (1995), die beide eine ähnliche Verteilung der ADM-R mRNA beschrieben. Die ebenfalls ubiquitäre Verteilung der ADM Rezeptor mRNA weist darauf hin, dass dem ADM mehr eine autokrine bzw. parakrine als eine endokrine Wirkweise zukommt, da das ADM Protein auch in allen Geweben nachweisbar war und somit an ADM Rezeptoren in unmittelbarer Umgebung binden kann. Auch wurde bis dato noch kein ADM sezernierendes Gewebe identifiziert, dass auf eine endokrine Wirkung des ADMs hinweisen

würde [Hinson et al. 2000 (Review)]. Für einen Hormoncharakter des Adrenomedullins würde die basale ADM Proteinkonzentration von 7 pmol/L (= 41 pg/L) im Blutplasma der Ratte sprechen, da diese im für Peptid- und Proteohormone typischen Konzentrationsbereich von 10^{-12} – 10^{-10} mol/L liegt [Löffler, Petrides: Biochemie und Pathobiochemie (6. Auflage)]. Aber aufgrund der ubiquitären ADM und ADM-R Genexpression und aufgrund von Befunden, die auf eine konstitutive Sekretion des ADM hindeuten (Isumi et al. 1998B, Sugo et al. 1994B, Takahashi et al. 1998), ist es wahrscheinlicher, dass die im Blutplasma bestimmte ir-ADM Proteinkonzentration einen Überschuss des von den Zellen sezernierten ADMs darstellt.

5.1.2. Einfluss von Hypoxie auf die ADM Genexpression

5.1.2.1. Organe und Aorta

Die ADM mRNA wurde in allen Organen einschliesslich der Aorta durch Hypoxie (8%O_2), Kohlenmonoxid (0,1%) und Kobalt-II-chlorid (60mg/kg) verstärkt exprimiert. Auch während Erkrankungen wie z.B. bei der Sepsis bzw. beim septischen Schock (Ehlenz et al. 1997; Hirata et al. 1996), während der zyanotischen Herzkrankheit (Yoshibayashi et al. 1999) oder bei Tumoren (Satoh et al. 1995, Liu et al. 1997) wurden erhöhte ADM mRNA und Proteinkonzentrationen nachgewiesen. Die in der vorliegenden Arbeit in den Organen und besonders in der Aorta gefundene starke Induktion der ADM Genexpression während Hypoxie könnte möglicherweise die erhöhte ADM Genexpression während der o.g. pathologischen Zustände, bei denen ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffverbrauch vorliegt, erklären.

Bisher wurde die ADM Genexpression in der Lunge (Zhao et al. 1996) und im Gehirn (Wang et al. 1995) unter Hypoxie untersucht, wobei sich aber kein einheitliches Bild ergab. Die nun in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde könnten die in ischämischen Gehirnregionen (Wang et al. 1995) erhöhten Adrenomedullin Proteinspiegel erklären. Zhao et al. (1996) hingegen fand in Lungen, die für 7 Tage mit Atemluft mit nur 10% Sauerstoffanteil inkubiert wurden, keinen Hinweis auf eine durch Hypoxie gesteigerte ADM mRNA Expression bzw. Proteinsynthese. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz zu den von mir erhaltenen Befunden in der Lunge könnte die schwächere Hypoxie (10%O_2) oder die Inkubationsdauer

von 7 Tagen sein, in der im Körper Mechanismen aktiviert wurden, die eine Induktion des ADM Genes verhinderten.

Wie die Befunde an Herz, Lunge, Leber, Gehirn, Nebennieren, Nieren und in der Aorta zeigen, ist Hypoxie 8%O_2 unter physiologischen Bedingungen ein effizienter Aktivator der ADM Genexpression. Zusätzlich wurde die ADM Genexpression auch durch Kohlenmonoxid und durch $CoCl_2$ in vivo induziert. Da auch die Genexpression von sauerstoffregulierten Genen wie EPO und VEGF in vivo durch Hypoxie 8%O_2, CO und $CoCl_2$ induziert wird, legt dies den Schluss nahe, dass auch ADM zu den sauerstoffregulierten Genen gehört.

Zahlreiche Publikationen zeigen, dass ADM vasodilatierend wirkt. (vgl. Review von Hinson et al. 2000). So wird in Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen der Aorta (Sugo et al. 1994) das ADM Gen stark exprimiert. Auch die durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass die glatte Gefäßmuskelzelllinie A7r5 AVSMC eine hohe basale ADM mRNA Expression aufwies und dass in A7r5 AVSMC unter Hypoxie die ADM mRNA Expression stark induziert wurde (vgl. Abb. 13). Diese Befunde deuten darauf hin, dass ADM bei der Regulation des Gefäßsystems eine Rolle spielt. Da Organe unterschiedlich stark durchblutet werden und einen unterschiedlichen Sauerstoffbedarf haben, ist es daher vorstellbar, dass die sowohl basal als auch unter Hypoxie unterschiedlich stark induzierte ADM Genexpression der Organe möglicherweise nur deren Vaskularisierungsgrad widerspiegelt. Im Gehirn, einem stark durchbluteten Organ, stieg die ADM Genexpression unter den Hypoxiestimuli stark an. Auch von Wang et al. (1995) wurden in ischämischen Gehirnregionen erhöhte ADM Konzentrationen gefunden. Somit könnte ADM die Gewebedurchblutung unter Hypoxie erhöhen und dazu beitragen ein Sauerstoffdefizit zu kompensieren.

5.1.2.2. Nierenkortex, äußeres und inneres Nierenmark

Auch in den Nierenzonen zeigte sich unter den hypoxischen Manövern die schon in der Niere und in den Organen beobachtete Induktion der ADM Genexpression. Die ADM mRNA Expression wurde im äußeren und vor allem im inneren Nierenmark noch stärker durch die Hypoxiestimuli induziert als im Nierenkortex, obwohl das äußere und vor allem das innere Nierenmark unter physiologischen Bedingungen eigentlich schon hypoxisch sein sollten (Cohen et al. 1979, Schurek et al. 1988). Ein möglicher Grund für die hohe ADM mRNA Expression im inneren Nierenmark unter Hypoxie könnte einerseits darin liegen, dass das ADM Gen erst ab Unterschreiten eines gewissen Sauerstoffpartialdrucks verstärkt induziert

wird [in vivo war bei den Experimenten der Sauerstoffgehalt der Atemluft 8%O_2, vgl. auch Zhao et al. (1996), der bei 10%O_2 keine Induktion der ADM Genexpression feststellte]. Andererseits zeigten schon die in vivo Versuche in den verschiedenen Organen eine unterschiedliche ADM Genexpression unter den Hypoxiestimuli. Somit könnten die verschiedenen Zelltypen des äußeren und inneren Nierenmarks, nämlich die Endothelzellen der vasa recta, die Epithelzellen der Henleschen Schleifen oder der Sammelrohre bzw. die interstitiellen Bindegewebszellen die verstärkte ADM Genexpression unter Hypoxie bewirken.

5.1.2.3. Zellkulturbefunde

Die ADM mRNA Expression wurde auch in verschiedenen Zelltypen bestimmt, um eine möglicherweise unterschiedliche ADM Genexpression einzelner Zelltypen zeigen zu können. So wurde auch in glatten Gefäßmuskelzellen [A7r5 AVSMC], in Primärkulturen von Hepatozyten und Mesangialzellen sowie in glomerulären Endothelzellen die ADM Genexpression durch Hypoxie induziert. Diese in vitro Befunde bestätigten einerseits die in vivo Befunde und andererseits in vitro Studien, bei denen Hypoxie einen Anstieg der ADM mRNA in den Zellen und/oder des ADM Proteins im Kulturmedium bewirkte wie zum Beispiel in der humanen kolorektalen Karzinomzelllinie DLD-1 (Nakayama et al. 1998B), in Endothelzellen von humanen Koronaraterien (Nakayama et al. 1999B) oder in humanen Glioblastomzellen (Kitamura et al. 2000). Dies weist auf einen ähnlichen Aktivierungsmechanismus der ADM Genexpression unter Hypoxie in ADM exprimierenden Zellen hin.

Zellkulturexperimente zeigen, dass das Adrenomedullingen auch in vitro ähnlich reguliert wird, wie klassisch sauerstoffregulierte Gene, die unter der Kontrolle des Hypoxie-induzierten Transkriptionsfaktors 1 (HIF 1) stehen (Bunn et al. 1996, Wenger et al. 1997). So wurden mehrere mögliche DNA–Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor HIF 1 im 5´-Promotorbereich des Mausadrenomedullingenes lokalisiert (Cormier-Regard et al. 1998). Auch die Daten von Nguyen et al. (1999) und Gararyoa et al. (2000) wiesen auf eine Beteiligung des HIF 1 an der Regulation des ADM Genes unter Sauerstoffmangel hin. Der Befund, dass durch Kobalt, das sauerstoffregulierte Gene induziert, in vivo die ADM Genexpression in ähnlicher Weise wie durch Sauerstoffmangel aktiviert wurde zusammen mit den Ergebnissen der in vitro Studien, in denen Kobalt die ADM Genexpression aktivierte,

lässt den Schluss zu, dass ADM in der Tat zu den Genen gehört, die durch eine Abnahme des Sauerstoffpartialdrucks reguliert werden (Bunn et al. 1996).

Obwohl sauerstoffregulierte Gene durch Hypoxie in der Zellkultur deutlich induziert bzw. gehemmt werden, ändert sich die Genexpression der Mehrzahl dieser Gene unter einem verminderten Sauerstoffpartialdruck im Gesamtorganismus nicht oder nur gering. (Breitner-Johnson et al. 1997, Bucher et al. 1996, Sandner et al. 1996). Dies lässt darauf schliessen, dass unter physiologischen Bedingungen diese Gene nicht durch den Sauerstoffpartialdruck kontrolliert werden, sondern von anderen Parametern. Im Gegensatz dazu scheint das Adrenomedullingen auch in vivo in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck reguliert zu sein.

Zusammenfassend zeigen die Befunde, dass die ADM Genexpression sowohl in vivo als auch in vitro durch die Hypoxiestimuli (O_2-Mangel, CO, $CoCl_2$) induziert wird. Dabei ähnelt die schnelle und deutliche Induktion des ADM Genes unter Hypoxie der des EPO Genes, welches als der Prototyp eines sauerstoffregulierten Genes betrachtet wird (Jelkmann et al. 1992).

5.1.3. Einfluss von Hypoxie auf die ADM-R mRNA Expression in vivo

Auch die ADM-R mRNA wurde in allen Organen und Geweben – mit Ausnahme der Leber – durch Hypoxie, Kohlenmonoxid oder Kobalt-II-chlorid verstärkt exprimiert. Diese Aktivierung der ADM-R Genexpression war vergleichbar mit der ADM Genexpression bei Hypoxie. Dies weist darauf hin, dass auch das ADM-R Gen zu den sauerstoffregulierten Genen gehört. Zu den erhobenen Daten passen auch Befunde von Zhao et al. (1996), der eine Zunahme der Bindungsstellen für ADM in chronisch hypoxischem Lungengewebe beschrieb. Hingegen änderte sich die ADM-R mRNA Expression in Herzmuskelzellen bei Hypoxie nicht (Cormier-Regard et al. 1998). Ein Grund für diesen zu den eigenen Ergebnissen unterschiedlichen Befund von Cormier-Regard et al. (1998) könnte darin liegen, dass der ADM-R durch Hypoxie zelltypspezifisch reguliert wird. Diese mögliche zelltypspezifische Regulation der ADM-R Genexpression zeigt auch der Befund von Ladoux et al. (2000), die in Astrozyten unter Hypoxie keine Änderung der ADM-R mRNA, der CRLR mRNA und der RAMP (1-3) mRNA Expression, wohl aber eine Erhöhung der RDC-1 mRNA fand. Auch eigene in vivo Befunde weisen auf eine mögliche zelltypspezifische Expression des ADM-R hin, da im Gegensatz zu allen anderen Organen und Geweben in der Leber unter Hypoxie 8%O_2 und Kobalt die ADM-R mRNA Expression signifikant vermindert war.

5.1.4. Schlussfolgerung

Die vorliegenden in vivo und in vitro Ergebnisse zeigen, dass Hypoxie ein wesentlicher Regulator des ADM Systems ist und lassen den Schluss zu, dass das ADM Gen und das ADM-R Gen zu den sauerstoffregulierten Genen gehören. Eine ähnliche Beobachtung, dass Hypoxie sowohl Ligand als auch dessen Rezeptor stimuliert, wurde schon für das Vascular endothelial growth factor (VEGF) System beschrieben (Sandner et al. 1997; Tuder et al. 1995). Der VEGF ist wie EPO ebenfalls ein typisches sauerstoffreguliertes Gen. Die Funktion des VEGF Systems liegt unter anderem in der Neubildung von Kapillaren, die in hypoxischem Gewebe die Sauerstoffversorgung verbessern. Neben der Angiogenese durch VEGF und der Erythropoese durch EPO verfügt der Körper mit der für das ADM System charakteristischen Vasodilatation über eine weitere Möglichkeit, um über das Gefäßsystem mittelfristig eine Sauerstoffminderversorgung der Gewebe zu kompensieren.

5.2. Einfluss von Zytokinen auf das ADM System

5.2.1. Einfluss von Zytokinen und NO auf die ADM Genexpression

Neben dem Einfluss von Hypoxie wurde auch die Wirkung von Zytokinen auf die ADM Genexpression untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die ADM mRNA Expression in glatten Gefäßmuskelzellen (A7r5 AVSMC) durch die Kombination der inflammatorischen Zytokine TNFα, Il-1ß und IFNγ, die für die Induktion und Prolongation einer Entzündungsreaktion bedeutend sind, stark induziert wurde. Dieser Befund bestätigte Veröffentlichungen, in denen TNFα und Il-1ß zu einem Anstieg der ADM mRNA in glatten Gefäßmuskelzellen (Sugo et al. 1994B und 1995), in retinalen Epithelzellen (Udono et al. 2000) und in Endothelzellen (Isumi et al. 1998B) führte. Ebenso aktivierten bakterielle Lipopolysaccharide [(LPS) = Endotoxine], die inflammatorische Zytokine induzieren können, die Adrenomedullin Genexpression sowohl in vivo (Shoji et al. 1995) als auch in Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen (Samson 1999), Makrophagen und Monozyten (Zaks-Zilberman et al. 1998, Nakayama et al. 1999A). Wie die ADM Genexpression durch LPS bzw. inflammatorische Zytokine aktiviert wird, wurde noch nicht näher untersucht. Ein Anhaltspunkt für den Signaltransduktionsweg, über den die ADM Genexpression durch inflammatorische Zytokine induziert werden könnte, wurde in der Genexpression der iNOS gefunden. So wird die induzierbare Form der NO Synthasen (iNOS) durch LPS wie auch durch inflammatorische Zytokine (z.B. TNFα, Il-1ß und IFNγ) in Makrophagen und vielen anderen Zelltypen aktiviert (Moncada et al. 1991, Nathan et al. 1994) [Die iNOS wird innerhalb weniger Stunden induziert und die NO Produktion ist im Vergleich zur endothelialen NOS bzw. neuronalen NOS um ein Vielfaches stärker]. Die Bestimmung der iNOS mRNA in den A7r5 AVSMC bestätigte die für inflammatorische Zytokine beschriebene Aktivierung der iNOS Genexpression. Deshalb wurde die Wirkung von NO auf die ADM Genexpression näher untersucht. Die durch Zytokine induzierte ADM mRNA Expression wurde durch Hemmung der NO Bildung deutlich vermindert. Auch durch die NO Donoren SNAP und DETA NONOate wurde die ADM mRNA konzentrations– und zeitabhängig hochreguliert. Die verminderte Wirkung der Zytokine unter L-NAME und die verstärkte Wirkung der NO Donoren auf die ADM mRNA Expression zeigen, dass NO ein direkter Aktivator der ADM Genexpression ist, und dass ein Großteil der Zytokinwirkung über NO vermittelt wird. ADM scheint somit zu der erst kürzlich entdeckten und rasch

wachsenden Gruppe von Genprodukten zu gehören, die durch NO induziert werden können. Zu dieser Gruppe gehören, soweit dies bis dato bekannt ist, unter anderem Interleukin-8 [(Il-8); Fowler et al. 1999, Watson et al. 1998)], Makrophagen inhibierendes Protein-1α [(MIP-1α) (Sherry et al. 2000, Taichman et al. 2000], die Tyrosinkinase Flt-1 (Frank et al. 1999), Vascular endothelial growth factor (VEGF) [Frank et al. 1999, Hofbauer und Sandner nicht publizierte Befunde] und Cyclooxygenase 2 (COX2) [Diaz-Cazorla et al. 1999, Hofbauer und Sandner nicht publizierte Befunde]. Die NO induzierbaren Gene können durch ihre Abhängigkeit von cGMP, das durch die NO abhängige Induktion der löslichen Guanylatcyclase gebildet wird, unterschieden werden. So wird der VEGF Rezeptor Flt durch NO cGMP abhängig (Frank et al. 1999), die Mehrzahl der NO induzierbaren Gene (s.o.) wird jedoch cGMP unabhängig aktiviert. Unsere Ergebnisse zeigen, dass der cGMP Signalweg nicht an der Induktion der ADM Genexpression beteiligt ist, da einerseits die ADM Genexpression durch das cGMP-Analogon 8-Bromo-cGMP im Vergleich zu den Kontrollbedingungen nicht verändert wurde, andererseits durch ODQ, einem spezifischen Hemmstoff der löslichen Guanylatcyclase, die ADM mRNA unter NO-Zufuhr nicht vermindert wurde.

Außer in A7r5 AVSMC, wurde die ADM Genexpression auch in Primärkulturen von Hepatozyten und Mesangialzellen sowie in glomerulären Endothelzellen induziert. Dies zeigt, dass es sich bei der Induktion der ADM Genexpression durch NO um einen mehr allgemeinen und für viele Zelltypen gültigen Regulationsmechanismus handelt.

5.2.2. Einfluss von Zytokinen und NO unabhängiger Effekte auf die ADM Genexpression

Wie die Versuche (Abb. 17, 23-24) zeigten, wurde die Wirkung der Zytokine auf die ADM Genexpression noch über einen von NO unabhängigen Weg vermittelt. Zum einen wurde die ADM mRNA Expression unter der gleichzeitigen Inkubation der A7r5 AVSMC mit Zytokinen und dem NOS Inhibitor L-NAME induziert, zum anderen zeigte der zeitliche Verlauf der ADM mRNA und der iNOS mRNA Expression, dass die ADM mRNA bereits vor der iNOS mRNA hochreguliert wurde, was auf einen zusätzlichen von NO unabhängigen Effekt der Zytokine auf die ADM Genexpression hinweist.

Eine Erklärung dieser Befunde kann in der direkten Wirkung der Zytokine auf die Expression von Genen wie zum Beispiel der Induktion der iNOS selbst gefunden werden. Für Il-1ß und

TNFα wurden ähnliche Signalwege beschrieben. So reagieren diese mit membrangebundenen Rezeptoren und aktivieren über eine Signalkaskade unter anderen den Transkriptionsfaktor NF-kappaB (Baeuerle 1998), für welchen auf dem Adrenomedullinpromotor mögliche DNA-Bindungsstellen existieren (Hattori et al. 1999). Diese Bindungsstellen könnten möglicherweise die ähnliche Wirkung von Il-1ß und TNFα auf die ADM Genexpression erklären. IFNγ hingegen führte zu keiner wesentlichen Änderung der ADM Genexpression. Ein Grund dafür könnte in dem von Il-1ß und TNFα unterschiedlichen Signaltransduktionsweg liegen, da IFNγ über den JAK/STAT Signalweg wirkt (Leaman et al. 1996, Stark et al. 1998). Die Inkubation von Il-1ß bzw. von TNFα mit IFNγ führte zu einer wesentlich stärkeren Aktivierung der ADM Genexpression als es die jeweilige Summation der Einzelwirkungen erwarten ließe. Dies lässt auf eine potenzierende und synergistische Wirkung von IFNγ auf die von Il-1ß und/oder TNFα induzierte ADM Genexpression schließen. Ein ähnlicher Effekt des IFNγ wurde auch schon für Insulin produzierende Zellen beschrieben (Cetkovic-Cvrlje et al. 1994).

Zusammenfassend zeigen die erhobenen Befunde, dass die Wirkung der inflammatorischen Zytokine auf die ADM Genexpression hauptsächlich über NO vermittelt wird, wobei eine cGMP Beteiligung ausgeschlossen werden konnte. Die Ergebnisse weisen aber auch auf eine zusätzliche NO unabhängige Wirkung der Zytokine auf die ADM Genexpression hin.

5.2.3. Schlussfolgerung

Die Ergebnisse zeigen, dass die ADM Genexpression durch Zytokine stark induziert wird und somit ADM bei entzündlichen Pathogenesen eine Rolle spielen kann. Die während der Sepsis auftretenden hohen ADM Konzentrationen sind daher teilweise durch die von Endotoxinen induzierten Zytokine bedingt. Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, induzieren Zytokine die ADM Genexpression überwiegend durch das von der iNOS synthetisierte NO. Da auch bereits gezeigt wurde, dass ADM NO induzieren kann (vgl. 1.7.4.), weist dies möglicherweise auf einen „positiven feed-back“ Mechanismus von NO und ADM hin. Aus diesen positiven NO – ADM Interaktionen kann eine substantielle, langandauernde und auf den ganzen Körper wirkende Vasodilatation resultieren, die zu einer vom Körper nicht mehr beeinflussbaren Autoregulation des Gefäßtonus und somit zum septischen Schock führen könnte.

5.3. Einfluss von Hypoxie und Zytokinen auf die ADM Genexpression

Die Untersuchung der kombinierten Wirkung von Hypoxie und Zytokinen bzw. NO Donoren auf die ADM Genexpression wurde durchgeführt, da während vieler inflammatorischer Zustände wie z.B. der Sepsis oder des septischen Schocks, Wundheilung, usw. auch ischämische bzw. hypoxische Gewebsbereiche auftreten. Zusätzlich gibt es erste Befunde, die eine Interaktion von Hypoxie und Zytokinen bzw. NO Donoren bei sauerstoffregulierten Genen zeigten. So konnte bei sauerstoffregulierten Genen durch NO die Hypoxieantwort einerseits vermindert wie es am Beispiel des EPO Genes in vivo (Todorov et al. 2000) und in vitro (Schobersberger et al. 1996) bereits demonstriert wurde, andererseits auch verstärkt werden [z.B. das VEGF Gen (Dulak et al. 2000)]. Auch wurde gezeigt, dass inflammatorische Zytokine die Erythropoietinsynthese unter Hypoxie reduzierten (Faquin et al. 1992) und somit ebenfalls die Hypoxieantwort von Genen beeinflussen können.

Die in der vorgelegten Arbeit erhobenen Befunde zeigten, dass die Kombination der Zytokin-(3)-kombination mit je einem hypoxischen Stimulus (O_2-Mangel, DFX, $CoCl_2$) eine stärkere Wirkung auf die ADM mRNA Expression in A7r5 AVSMC hatte als die Zytokin-(3)-kombination bzw. der hypoxische Stimulus alleine. Quantitative Auswertungen der Expressionssteigerungen legten den Schluss nahe, dass die Wirkungen von der Zytokin-(3)-kombination und Hypoxie additiv sind. Auch die ADM mRNA Abundanz wurde durch die Kombination NO Donor und Hypoxie stärker erhöht als unter der Einzelinkubation mit Hypoxie bzw. NO Donor. Eine gewisse Ausnahme bildete jedoch die Kombination NO Donor und $CoCl_2$, bei der die ADM mRNA Abundanz die Summe der einzelnen ADM mRNA Expressionen nicht erreichte, was auf einen inhibierenden Effekt von $CoCl_2$ auf die vom NO Donor bzw. vom NO Donor auf die von $CoCl_2$ induzierte ADM Genexpression hinweisen könnte. Wie schon seit längerem bekannt ist, stehen sauerstoffregulierte Gene unter der transkriptionellen Kontrolle des Transkriptionsfaktors HIF 1. Somit könnten die Befunde von Sandau et al. (2001) möglicherweise die inhibierende Wirkung der Kombination NO Donor und $CoCl_2$ erklären. Sandau et al. (2001) untersuchte in LLC-PK_1 Zellen die Einflüsse von Hypoxie und/oder NO Donoren auf den HIF-1α und stellte eine Reduzierung des HIF-1α Proteingehalts unter $CoCl_2$ und dem NO Donor GSNO (S-Nitrosoglutathion) gegenüber der alleinigen Inkubation mit $CoCl_2$ fest. Auch wurde ein hemmender Einfluss von NO auf den bei $CoCl_2$ Behandlung verstärkt synthetisierten HIF-1α beschrieben (Liu et al. 1998, Huang et al. 1999, Sogawa et al. 1998). Eine Verringerung der HIF-1α-Proteinkonzentration durch NO unter Hypoxie vermindert die Bildung des Transkriptionsfaktors HIF 1, die bei

sauerstoffregulierten Genen wie EPO, VEGF (Wenger et al. 1997) und auch möglicherweise bei ADM zu einer geringeren Induktion der Genexpression durch Hypoxie führt. Der HIF 1 wird bei Normoxie nicht gebildet, da das HIF 1α Protein sofort nach dessen Bildung durch den Ubiqutin-Proteasomenkomplex abgebaut wird (Salceda et al. 1997). Es konnte aber gezeigt werden, dass der HIF-1α bei Normoxie durch NO Donoren und durch von der iNOS gebildetes NO stabilisiert wurde. Dieser Befund weist daher auf eine weitere Möglichkeit hin, wie extrazellulär bzw. intrazellulär gebildetes NO die ADM Genexpression beeinflussen könnte.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Zytokine und die untersuchten hypoxischen Stimuli (O_2-Mangel, DFX, $CoCl_2$) eine additive Wirkung auf die ADM mRNA Expression haben. Einen hohen Anteil an der Zytokin-vermittelten ADM Genexpression hat das durch die iNOS gebildete NO. So wurde auch die ADM Genexpression durch NO Donoren unter Hypoxie 0,5%O_2 und Deferoxamin noch zusätzlich induziert.

5.4. Zusammenfassung

Ein Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von Hypoxie auf das ADM System an Sprague Dawley Ratten.

Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl die ADM als auch ADM-R mRNA Expression in den Organen und Geweben durch Hypoxie erhöht wurde (Ausnahme: in der Leber wurde die ADM-R mRNA Expression durch Hypoxie 8%O_2 und $CoCl_2$ gehemmt). Die Induktion der ADM mRNA Expression führte zu einer verstärkten ADM Proteinsynthese in den Organen sowie im Blutplasma der Sprague Dawley Ratte. Hypoxie führte auch in glatten Gefäßmuskelzellen, in Primärkulturen von Hepatozyten und Mesangialzellen sowie in glomerulären Endothelzellen zu einer deutlichen Erhöhung der ADM mRNA Abundanz. Diese Befunde auf Organ- und Zellebene zeigen, dass Hypoxie sowohl in vivo als auch in vitro ein Aktivator der ADM Genexpression ist.

In nachfolgenden Studien wurde auch der Einfluss der inflammatorischen Zytokine TNFα, Il-1ß und IFNγ auf die ADM Genexpression in glatten Gefäßmuskelzellen untersucht.

Die ADM Genexpression wurde durch TNFα bzw. Il-1ß induziert. IFNγ hingegen änderte die ADM mRNA Expression nicht. Die Wirkung der Zweierkombination TNFα und Il-1ß auf die ADM Genexpression war additiv. TNFα und IFNγ sowie Il-1ß und IFNγ führten zu einer ADM mRNA Expression, die größer als die Summe der Einzeleffekte dieser Zytokine war. Diese Befunde weisen auf eine synergistische Wirkung von IFNγ hin. Dieser Synergismus des IFNγ wurde auch in der Zytokin-3-kombination festgestellt.
Die Untersuchung des Wirkmechanismus der Zytokine auf die ADM Genexpression zeigt, dass die ADM Genexpression durch die Zytokine TNFα und Il-1ß in glatten Gefäßmuskelzellen größtenteils über NO induziert wird. Dabei ist der Guanylatcyclase – cGMP Signaltransduktionsweg nicht an der NO Wirkung beteiligt. Jedoch können Zytokine auch zu einem geringeren Teil die ADM Genexpression auf einem von NO unabhängigen Weg induzieren.
Die ADM mRNA wurde auch in Primärkulturen von Hepatozyten und Mesangialzellen sowie in glomerulären Endothelzellen durch NO verstärkt exprimiert. Somit zeigt sich, dass neben Hypoxie auch NO ein Aktivator der ADM Genexpression ist.

Angesichts dessen, dass die ADM Genexpression sowohl durch Hypoxie als auch durch Zytokine induziert wurde, wurde die Interaktion der beiden Stimuli näher untersucht. Dabei wurde eine additive Wirkung der ADM mRNA Abundanz unter Hypoxie und der Zytokin-3-kombination beobachtet, wobei die ADM mRNA Expression durch den NOS Inhibitor L-Name deutlich reduziert wurde. Die ADM Genexpression wurde zusätzlich durch die NO Donoren SNAP und DETA NONOate unter Hypoxie 0,5%O_2 und Deferoxamin überadditiv bzw. additiv induziert.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Expression des ADM Genes in vivo durch Hypoxie und in vitro sowohl durch Hypoxie als auch durch NO induzierbar ist.

6. Literaturverzeichnis

Øie E., Vinge E., Yndestad A., Sandberg C., GrØgaard H.K., Attramadal H. ***2000*** Induction of a myocardial adrenomedullin signaling system during ischemic heart failure in rats. Circulation. 101:415-420.

Abe K., Minegishi T., Tano M., Hirakawa T., Tsuchiya M., Kangawa K., Kojima M., Ibuki Y. ***1998*** Expression and effect of adrenomedullin on rat granulosa cell. Endocrinology 139:5263–5266.

Aiyar N., Rand K., Elshourbagy N.A., Zeng Z., Adamou J.E., Bergsma D.J., Li Y. ***1996*** A cDNA encoding the calcitonin gene-related peptide type 1 receptor. J. Biol. Chem. 271:11325-11329.

Alonso S., Minty A., Bourlet Y., Buckingham M. ***1986*** Comparison of three actin-coding sequences in the mouse; evolutionary relationships between the actin genes of warm-blooded vertebrates. J. Mol. Evol. 23(1):11-22.

Andreis P.G., Tortorella C., Mazzocchi G., Nussdorfer G.G. ***1998*** Prodrenomedullin N-terminal 20 peptide inhibits aldosterone secretion of human adrenocortical and Conn´s adenoma cells: comparison with adrenomedullin effect. J. Clin. Endocrinol. Metab. 83:253-257.

Awad B.E., Kreft B., Wolber E.M., Hellwig-Bürgel T., Metzen E., Fandrey J., Jelkmann J. ***2000*** Hypoxia and interleukin-1ß stimulate vascular endothelial growth factor production in human proximal tubular cells. Kidney Int. 58:43-50.

Baeuerle P.A. ***1998*** Pro-inflammatory signaling: last pieces in the NF-kappaB puzzle? Curr.Biol. 8:R19-R22.

Barker S., Kapas S., Corder R., Clark A.J. ***1996*** Adrenomedullin acts via stimulation of cyclic AMP and not via calcium signaling in vascular cells in culture. J. Hum.Hypertens. 10:421-423.

Bianchi L., Tacchini L., Cairo G. ***1999*** HIF-1-mediated activation of transferrin receptor gene transcription by iron chelation. Nucleic. Acids. Res. 27(21):4223-4227.

Bonmann E., Suschek C., Spranger M., Kolb-Bachofen V. ***1997*** The dominant role of exogenous or endogenous interleukin-1 beta on expression and activity of inducible nitric oxide synthase in rat microvascular brain endothelial cells. Neurosci. Lett. 230(2):109-112.

Bretner-Johnson D., Shull G.E., Dedman J.R., Millhorn D.E. ***1997*** Regulation of gene expression by hypoxia: a molecular approach. Respir. Physiol. 110:87-97.

Bucher M., Sandner P., Wolf K., Kurtz A. ***1996*** Cobalt but not hypoxia stimulates PDGF gene expression in rats. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 271:E451-E457.

Bunn F., Poyton R.O. ***1996*** Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. Physiol. Rev. 76:839-885.

Cameron V.A., Fleming A.M. ***1998*** Novel sites of adrenomedullin gene expression in mouse and rat tissues. Endocrinology 139:2253–2264.

Caron K.M., Smithies O. ***2001*** Extreme hydrops fetalis and cardiovascular abnormalitis in mice lacking a functional adrenomedullin gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98(2):615-619.

Cetkovic-Cvrlje M., Eizirik D.L. ***1994*** TNF-alpha and IFN-gamma potentiate the deleterious effects of IL-1 beta on mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide. Cytokine. 6(4):399-406.

Champion H.C., Duperier C.D., Fitzgerald W.E., Lambert D.G., Murphy W.A., Coy D.H., Kadowitz P.J. ***1996*** [MPR14]-rADM(14-50), a novel analog of adrenomedullin possesses potent vasodilatory activity in the hindlimb vascular bed in the cat. Life Sci. 59:L1-L7.

Chester A.H., Borland J.A., Buttery L.D., Mitchell J.A., Cunningham D.A., Hafizi S., Hoare G.S., Springall D.R., Polak J.M., Yacoub M.H. ***1998*** Induction of nitric oxide synthase in human vascular smooth muscle: interactions between proinflammatory cytokines. Cardiovasc. Res. 38(3):814-821.

Cheung B., Leung R. ***1997*** Elevated plasma levels of human adrenomedullin in cardiovascular, respiratory, hepatic and renal disorders. Clin. Sci. Colch. 92:59-62.

Chiba T., Yamaguchi A., Yamatani T., Nakamura A., Morishita T., Inui T., Fukase M., Noda T., Fujita T. ***1989*** Calcitonin gene-related peptide antagonist human CGRP-(8-37). Am. J. Physiol. 256:E331-E335.

Chini E.N., Chini C.C., Bolliger C., Jougasaki M., Grande J.P., Burnett Jr. J.C., Dousa T.P. ***1997*** Cytoprotective effects of adrenomedullin in glomerular cell injury: central role of cAMP signaling pathway. Kidney Int. 52:917–925.

Chini E.N., Choi E., Grande J.P., Burnett J.C., Dousa T.P. ***1995*** Adrenomedullin suppresses mitogenesis in rat mesangial cells via cAMP pathway. Biochem. Biophys. Res. Commun. 215:868–873.

Chimczynski P., Sacchi N. ***1987*** Single-step method of RNA isolation by acid guadinium thiocynate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162:156-159.

Cohen J.J. ***1979*** Is the function of the renal papilla coupled exclusively to an anaerobic pattern of metabolism? Am. J. Physiol. 326(5):F423-F433.

Coppock H.A., Owji A.A., Austin C., Upton P.D., Jackson M.L., Gardiner J.V., Ghatei M.A., Bloom S.R., Smith D.M. ***1999*** Rat-2 fibroblasts express specific adrenomedullin receptors, but not calcitonin-gene-related-receptors, which mediate increased intracellular cAMP and inhibit mitogen activated protein kinase activity. Biochem. J. 338(Part 1):15-22

Cormier-Regard S., Nguyen S.V., Claycomb W.C. ***1998*** Adrenomedullin gene expression is developmentally regulated and induced by hypoxia in rat ventricular cardiac myocytes. J. Biol. Chem. 273:17787-17792.

Dennis T., Fournier A., Caudieux A., Pomerleau F., Jolicoeur F.B., St. Pierre S., Quirion R. ***1990*** hCGRP8-37, a calcitonin gene-related peptide antagonist revealing calcitonin gene-related peptide receptor heterogeneity in brain and periphery. J. Pharmacol. Exp. Ther. 254:123-128.

Diaz-Cazorla M., Perez-Sala D., Lamas S. ***1999*** Dual effect of nitric oxide donors on cyclooxygenase –2 expression in human mesangial cells. J. Am. Soc. Nephrol. 10:943-952.

Dulak J., Jozkowicz A., Deminska-Kiec A. ***2000*** Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 20:659-666.

Eckardt K.-U., Ring A., Maier M., Gess B., Fabbro D., Kurtz A. ***1994*** Hypoxia-induced accumulation of erythropoietin mRNA in isolated hepatocytes is inhibited by protein kinase C. Pflügers Arch. – Eur. J. Physiol. 426:21-30.

Edwards R.M., Trizna W., Aiyar N. ***1997*** Adrenomedullin: a new peptide involved in cardiorenal homeostasis? Exp. Nephrol. 5:18-22.

Eguchi S., Hirata Y., Kano H., Sato K., Watanabe Y., Watanabe T.X., Nakajima K., Sakakibara S., Marumo F. ***1994*** Specific receptors for adrenomedullin in cultured rat vascular smooth muscle cells. FEBS Lett. 340:226-230.

Ehlenz K., Koch B., Preuss P., Simon B., Koop I., Lang R.E. ***1997*** High levels of circulating adrenomedullin in severe illness: correlation with C-reactive protein and evidence against the adrenal medulla as site of origin. Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes. 105(3):156-162.

Elshourbagy N.A., Adamou J.E., Swift A.M., Disa J., Mao J., Ganguly S., Bergsma D.J., Aiyar N. ***1998*** Molecular cloning and characterization of the porcine calcitonin gene-related peptide receptor. Endocrinology 139:1678-1683.

Entzeroth M., Doods H.N., Wieland H.A., Wienen W. 1995 Adrenomedullin mediates vasodilation via CGRP1 receptors. Life Sci. 56:L19-L25.

Eva C., Sprengel R. ***1993*** A novel putative G protein-coupled receptor highly expressed in lung and testis. DNA Cell. Biol. 12:393-399.

Faquin W.C., Schneider T.J., Goldberg M.A. ***1992*** Effect of inflammatory cytokines on hypoxia induced erythropoietin production. Blood. 79(8):1987-1994.

Feng C.J., Kang B., Kaye A.D., Kadowitz P.J., Nossaman B.D. ***1994*** L-NAME modulates responses to adrenomedullin in the hindquarters vascular bed of the rat. Life Sci. 55:L433-438

Fink J.S., Verhave M., Kasper S., Tsukada T., Mandel G., Goodman R.H. ***1988*** The CGTCA sequence motif is essential for biological activity of the vasoactive intestinal peptide gene cAMP-regulated enhancer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6662-6666.

Fluhmann B., Muff R., Hunziker W., Fischer J.A., Born W. ***1995*** A human orphan calcitonin receptor-like structure. . Biochem. Biophys. Res. Commun. 206:341-347.

Fowler A.A. 3rd, Fisher B.J., Sweeny L.B., Wallace T.J., Natarajan R., Ghosh S.S., Ghosh S. ***1999*** Nitric oxide regulates interleukin-8 gene expression in activated endothelium by inhibiting NF-kappaB binding to DNA: effects on endothelial function. Biochem. Cell. Biol. 77(3):201-208.

Frank S., Stallmayer B., Kämpfer H., Schaffner C., Pfeilschifter J. ***1999*** Differential regulation of vascular endothelial growth factor and its receptor fms-like-tyrosinekinase is mediated by nitric oxide in rat renal mesangial cells. Biochem J. 338:367-374.

Garayoa M., Martinez A., Lee S., Pio R., An W.G., Neckers L., Trepel J., Montuenga L.M., Ryan H., Johnson R., Gassmann M., Cuttitta F. ***2000*** Hypoxia-inducible factor –1 (HIF-1) up-regulates adrenomedullin expression in human tumor cell lines during oxygen deprivation: a possible promotion mechanism of carcinogenesis. Mol. Endocrinol. 14(6):848-862.

Goss S.P., Singh R.J., Hogg N., Kalyanaraman B. ***1999*** Reactions of NO, NO2 and peroxynitrite in membranes: physiological implictions. Free. Radic. Res. 31(6):597-606.

Gow A.J., Ischiropoulus H. ***2001*** Nitric oxide chemistry and cellular signaling. J. Cell. Physiol. 187(3):277-282.

Gumusel B., Chang J.K., Hyman A., Lippton H. ***1995*** Adrenotensin: an ADM gene product with the opposite effects of ADM. Life Sci. 57:L87-L90**.**

Gumusel B., Chang J.K., Hao Q., Hyman A., Lippton H. ***1996*** Adrenotensin: an adrenomedullin gene product contracts pulmonary blood vessels. Peptides 17(3):461-465.

Hall J.M., Siney L., Lippton H., Hyman A., Kang C.J., Brain S.D. ***1995*** Interaction of human adrenomedullin 13-52 with calcitonin gene-related peptide in the microvasculature in rat and hamster. Br. J. Pharmacol. 114:592-597.

Han Z.Q., Coppock H.A., Smith D.M., Van-Noorden S., Makgoba M.W., Nicholl C.G., Legon S. ***1997*** The interaction of CGRP and adrenomedullin with a receptor expressed in the rat pulmonary vascular endothelium. J. Mol. Endocrinol. 18:267-272.

Haneda M., Araki S., Sugimoto T., Togawa M., Koya D., Kikkawa R. ***1996*** Differential inhibition of mesangial MAP kinase cascade by cyclic nucleotides. Kidney Int. 50:384–391.

Harrison J.K., Barber C.M., Lynch K.R. ***1993*** Molecular cloning of a novel rat G-protein-coupled receptor gene expressed prominently in lung, adrenal and liver. FEBS Lett. 318:17-22.

Hattori Y., Mimura A., Akimoto K., Kasai K. ***1999*** Transcriptional regulation of adrenomedullin in vascular smooth muscle cells. Mol. Cell. Endocrinol. 147(1-2):143-147.

Hinson J.P., Kapas S., Smith D.M. ***2000*** Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide. Endocrine. Reviews. 21(1):138-167.

Hirata Y., Hayakawa H., Suzuki Y., Suzuki E., Ikenouchi H., Kohmoto O., Kimura K., Kitamura K., Eto T., Kangawa K., Matsuo H., Omata M. ***1995*** Mechanisms of adrenomedullin-induced vasodilation in the rat kidney. Hypertension 25:790-795.

Hirata Y., Mitaka C., Sato K., Nagura T., Tsunoda Y., Amaha K., Marumo F. ***1996*** Increased circulating adrenomedullin, a novel vasodilatory peptide, in sepsis. J. Clin. Endocrinol. Metab. 8184):1449-1453.

Hjelmqvist H., Keil R., Mathai M., Hubschle T., Gerstberger R. ***1997*** Vasodilation and glomerular binding of adrenomedullin in the rabbit kidney are not CGRP receptor mediated. Am. J. Physiol. 273:R716-R724.

Huang E.L., Willmore W.G., Gu J., Goldberg M.A., Bunn H.. ***1999*** Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activation by carbon monoxide and nitric oxide. J. Biol. Chem. 274:9038-9044.

Ichiki Y., Kitamura K., Kangawa K., Kawamoto M., Matsuo H., Eto T. ***1994*** Distribution and characterization of immunoreactive adrenomedullin in human tissue and plasma. FEBS. Lett. 338:6-10.

Imagawa M., Chiu R., Karin M. ***1987*** Transcription factor AP-2 mediates induction by two different signal-transduction pathways: protein kinase C and cAMP. Cell. 51:251-260.

Ishihara T., Kato J., Kitamura K., Katoh F., Fujimoto S., Kangawa K., Eto T. ***1997*** Production of adrenomedullin in human vascular endothelial cells. Life. Sci. 60:1763–1769.

Ishimitsu T., Kojima M., Kangawa K., Hino J., Matsuoka H., Kitamura K., Eto T., Matsuo H. ***1994*** Genomic structure of human adrenomedullin gene. Biochem. Biophys. Res. Commun. 203:631-639.

Ishizaka Y., Tanaka M., Kitamura K., Kangawa K., Minamino N., Matsuo H., Eto T. ***1994*** Adrenomedullin stimulates cyclic AMP formation in rat vascular smooth muscle cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 200:642-646.

Isumi Y., Minamino N., Katafuchi T., Yoshioka M., Tsuji T., Kangawa K., Matsuo H. ***1998A*** Adrenomedullin production in fibroblasts: its possible function as a growth regulator of Swiss 3T3 cells. Endocrinology 139:2552–2563.

Isumi Y., Shoji H., Sugo S., Tochimoto T., Yoshioka M., Kangawa K., Matsuo H., Minamino N. ***1998B*** Regulation of adrenomedullin production in rat endothelial cells. Endocrinology 139:838–846.

Iwasaki H., Eguchi S., Shichiri M., Marumo F., Hirata Y. ***1998*** Adrenomedullin as a novel growth-promoting factor for cultured vascular smooth muscle cells: role of tyrosine kinase-mediated mitogen-activated protein kinase activation. Endocrinology 139:3432–3441.

Jahnke G.D., Miller M.J., Martinez A., Montuenga L., Cuttitta F. ***1997*** Adrenomedullin expression in the mouse mammary gland: evidence for the mature form in milk. J. Mol. Endocrinol. 19:279–289.

Jelkmann W. ***1992*** Erythropoietin: structure, control of production, and function. Physiol. Rev. 72:449-489.

Jensen B.L., Kramer B.K., Kurtz A. ***1997*** Adrenomedullin stimulates renin release and renin mRNA in mouse juxtaglomerular granular cells. Hypertension. 29:1148-1155.

Jensen B.L., Gambaryan S., Schmaus E., Kurtz A. ***1998*** Effects of dietary salt on adrenomedullin and ist receptor mRNAs in rat kidney. Am. J. Physiol. 275:F55-F61.

Jougasaki M., Wei C.M., Aarhus L.L., Heublein D.M., Sandberg S.M., Burnett Jr. J.C. ***1995A*** Renal localization and actions of adrenomedullin: a natriuretic peptide. Am. J. Physiol. 268:F657–F663.

Jougasaki M., Wei C.M., Mckinley L.J., Burnett J.C. ***1995B*** Elevation of circulating and ventricular adrenomedullin in human congestive heart failure. Circulation. 92:286-289.

Kapas S., Brown D.W., Farthing P.M., Hagi P.E. ***1997*** Adrenomedullin has mitogenic effects on human oral keratinocytes: involvement of cyclic AMP. F.E.B.S. Lett. 418:287-290.

Kapas S., Catt K.J., Clark A.J. ***1995A*** Cloning and expression of cDNA encoding a rat adrenomedullin receptor. J. Biol. Chem. 270:25344-25347.

Kapas S., Clark A.J. ***1995B*** Identification of an orphan receptor gene as a type 1 calcitonin gene-related peptide receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 217:832-838.

Kapas S., Martinez A., Cuttitta F., Hinson J.P. ***1998*** Local production and action of adrenomedullin in the rat adrenal zona glomerulosa. J. Endocrinol. 156:477–484.

Kimura H., Weisz A., Kurashima Y., Hashimoto K., Ogura T., D´Acquisto F., Addeo R., Makuuchi M., Esumi H. ***2000*** Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. Blood. 95:189-197.

Kitamura K., Kangawa K., Kawamoto M., Ichiki Y., Nakamura S., Matsuo H., Eto T. ***1993A*** Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. Biochem. Biophys. Res. Commun. 192:553-560.

Kitamura K., Kato J., Kawamoto M., Tanaka M., Chino N., Kangawa K., Eto T. ***1998*** The intermediate form of glycine extended adrenomedullin is the major circulating molecular form in human plasma. Biocem. Biophys. Res. Commun. 244:551-555.

Kitamura K., Sakata J., Kangawa K., Kojima M., Matsuo H., Eto T. ***1993B*** Cloning and characterization of cDNA encoding a precursor for human adrenomedullin [published erratum appears in Biochem. Biophys. Res. Commun. 1994 Jul 15;202(1):643]. Biochem. Biophys. Res. Commun. 195:720:725.

Kitamura T., Takahashi K., Nakayama M., Murakami O., Hida W., Shirato K., Shibahara S. ***2000*** Induction of adrenomedullin during hypoxia in cultured glioblastoma cells. J. Neurochem. 75(5):1826-1833.

Koh O., Jiahuai H. ***2000*** The p38 signal transduction pathway: Activation and function. Cell. Sig. 12:1-13.

Kohno M., Hanehira T., Kano H., Horio T., Yokokawa K., Ikeda M., Minami M., Yasunari K., Yoshikawa J. ***1996*** Plasma drenomedullin concentrations in essential hypertension. Hypertension. 27:102-107.

Kox W.J., Volk T., Kox S.N., Volk H.D. ***2000*** Immunomodulatory therapies in sepsis. Intensive. Care. Med. 26 Suppl. 1:S124-128.

Kubo A., Minamino N., Isumi Y., Kangawa K., Dohi K., Matsuo H. ***1998B*** Adrenomedullin production is correlated with differentiation in human leukemia cell lines and peripheral blood monocytes. FEBS. Lett. 426:233–237.

Kubo A., Minamino N., Isumi Y., Katafuchi T., Kangawa K., Dohi K., Matsuo H. ***1998A*** Production of adrenomedullin in macrophage cell line and peritoneal macrophage. J. Biol. Chem. 273:16730–16738.

Kuchinke W., Hart R.P., Jonakait G.M. ***1995*** Identification of mRNAs regulated by interferon-gamma in cultured rat astrocytes by PCR differential display. Neuroimmunomodulation 2:347–355.

Kurtz A., Jelkmann W., Sinowatz F., Bauer C. ***1983*** Renal mesangial cells as a model for study of erythropoietin production. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80:4008-4011.

Ladoux A., Frelin C. ***2000*** Coordinated upregulation by hypoxia of adrenomedullin and one of its putative receptors (RDC-1) in cells of the rat blood-brain barrier. J.Biol. Chem. 275:39914-39919.

Lai K.N., Leung J.C.K., Yeung V.T.F., Lewis L.K., Nicholls M.G. ***1998*** Gene transcription and synthesis of adrenomedullin by cultured human renal cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 244:567–572.

Lang M.G., Paterno R., Faracci F.M., Heistad D.D. ***1997*** Mechanisms of adrenomedullin induced dilatation of cerebral arterioles. Stroke 28:181-185.

Leaman D.W., Leung S., Li X.,Stark G.R. ***1996*** Regulation of STAT-dependent pathways by growth factors and cytokines. The FASEB Journal. 10:1578-1588.

Lee W., Mitchell P., Tjian R. ***1987*** Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. Cell. 741-752.

Lewis L.K., Smith M.W., Brennan S.O., Yandle T.G., Richards A.M., Nicholls M.G. ***1997*** Degradation of human adrenomedullin(1–52) by plasma membrane enzymes and identification of metabolites. Peptides 18:733–739.

Libert F., Parmentier M., Lefort A., Dumont J.E., Vassart G. ***1990*** Complete nucleotide sequence of a putative G protein coupled receptor: RDC1. Nucleic. Acids. Res. 18(7):1917.

Liu J., Kahri A.I., Heikkila P., Voutilainen R. ***1997*** Adrenomedullin gene expression and its different regulation in human adrenocortical and medullary tumors. J. Endocrinol. 155:483–490.

Liu Y., Christou H., Morita T., Laughner E., Semenza G.L., Kourembanas S. ***1998*** Carbon monoxide and nitric oxide suppress the hypoxic induction of vascular endothelial growth factor gene via the 5´enhancer. J. Biol. Chem. 273:15257-15262.

Löffler G., Petrides P. ***1998*** Lehrbuch der Biochemie und Pathobiochemie. Springer Verlag. 6. Auflage:766.

Marinoni E., Di Iorio R., Alo P., Villaccio B., Alberini A., Cosmi E.V. ***1999*** Immunohistochemical localization of adrenomedullin in fetal and neonatal lung. Pediatric. Res. 45:282–285.

Marinoni E., Di Iorio R., Letizia C., Villaccio B., Scucchi L., Cosmi E.V. ***1998*** Immunoreactive adrenomedullin in human fetoplacental tissues. Am. J. Obstet. Gynecol. 179:784–787.

Martinez A., Cuttitta F., Teitelman G. ***1998*** Expression pattern for adrenomedullin during pancreatic development in the rat reveals a common precursor with other endocrine cell types. Cell. Tissue Res. 293:95–100.

Martinez A., Elsasser T.H., Muro C.C., Moody T.W., Miller M.J., Macri C.J., Cuttitta F. ***1997*** Expression of adrenomedullin and its receptor in normal and malignant human skin: a potential pluripotent role in the integument. Endocrinology 138:5597–5604.

Martinez A., Miller M.J., Unsworth E.J., Siegfried J.M., Cuttitta F. ***1995*** Expression of adrenomedullin in normal human lung and in pulmonary tumors. Endocrinology 136:4099–4105.

Martinez A., Weaver C., Lopez J., Bhathena S.J., Elsasser T.H., Miller M.J., Moody T.W., Unsworth E.J., Cuttitta F. ***1996*** Regulation of insulin secretion and blood glucose metabolism by adrenomedullin. Endocrinology 137:2626–2632.

McLatchie L.M., Fraser N.J., Main M.J., Wise A., Brown J., Thompson N., Solari R., Lee M.G., Foord S.M. ***1998*** RAMPs regulate the transport and ligand specifity of the calcitonin receptor-like receptor. Nature 393:333-339.

Meeran K., O'Shea D., Upton P.D., Small C.J., Ghatei M.A., Byfield P.H., Bloom S.R. ***1997*** Circulating adrenomedullin does not regulate systemic blood pressure but increases plasma prolactin after intravenous infusion in humans: a pharmacokinetic study. J. Clin. Endocrinol. Metab. 82:95–100.

Michibata H., Mukoyama M., Tanaka I., Suga S., Nakagawa M., Ishibashi R., Goto M., Akaji K., Fujiwara Y., Kiso Y., Nakao K. ***1998*** Autocrine/paracrine role of adrenomedullin in cultured endothelial and mesangial cells. Kidney Int. 53:979–985.

Michishita M., Minegishi T., Abe K., Kangawa K., Kojima M., Ibuki Y. ***1999*** Expression of adrenomedullin in the endometrium of the human uterus. Obstet. Gynecol. 93:66–70.

Miller M.J., Martinez A., Unsworth E.J., Thiele C.J., Moody T.W., Elsasser T., Cuttitta F. ***1996*** Adrenomedullin expression in human tumor cell lines. Its potential role as an autocrine growth factor. J. Biol. Chem. 271:23345-23351.

Miura K., Ebara T., Okumura M., Matsuura T., Kim S., Yukimura T., Iwao H. ***1995*** Attenuation of adrenomedullin-induced renal vasodilation by NG-nitro L-arginine but not glibenclamide. Br. J. Pharmacol. 115:917-924.

Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A. ***1991*** Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. Pharmac. Rev. 43:109-142.

Moody T.W., Miller M.J., Martinez A., Unsworth E., Cuttitta F. ***1997*** Adrenomedullin binds with high affinity, elevates cyclic AMP, and stimulates c-fos mRNA in C6 glioma cells. Peptides. 18:1111-1115.

Muff R., Leuthauser K., Buhlmann N., Foord S.M., Fischer J.A., Born W. ***1998*** Receptor activity modifying proteins regulate the activity of a calcitonin gene-related peptide receptor in rabbit aortic endothelial cells. F.E.B.S. Lett. 441:366-386.

Mulder H., Ahren B., Karlsson S., Sundler F. ***1996*** Adrenomedullin: localization in the gastrointestinal tract and effects on insulin secretion. Regul. Pept. 62:107–112.

Nakayama M., Takahashi K., Hara E., Murakami O., Totsune K., Sone M., Satoh F., Shibahara S. ***1998A*** Production and secretion of two vasoactive peptides, endothelin-1 and adrenomedullin, by a colorectal adenocarcinoma cell line, DLD-1. J. Cardiovasc. Pharmacol. 31(Suppl 1):S534–S536.

Nakayama M., Takahashi K., Murakami O., Murakami H., Sasano H., Shirato K., Shibahara S. ***1999A*** Adrenomedullin in monocytes and macrophages: possible involvement of macrophage derived adrenomedullin in atherogenesis. Clin. Sci. (Colch.) 97(2):247-251.

Nakayama M., Takahashi K., Murakami O., Shirato K., Shibahara S. ***1999B*** Induction of adrenomedullin by hypoxia in cultured human coronary artery endothelial cells. Peptides 20(6):769-772.

Nakayama M., Takahashi K., Murakami O., Shirato K., Shibahara S. ***1998B*** Induction of adrenomedullin by hypoxia and cobalt chloride in human colorectal carcinoma cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 243:514–517.

Nandha K.A., Taylor G.M., Smith D.M., Owji A.A., Byfield P.G., Ghatei M.A., Bloom S.R. ***1996*** Specific adrenomedullin binding sites and hypotension in the rat systemic vascular bed. Regul.Pept. 62:145-151.

Nathan C., Xie Q. ***1994*** Regulation of biosynthesis of nitric oxide. J.Biol. Chem. 269:13725-13728.

Nguyen S.V., Claycomb W.C. ***1999*** Hypoxia regulates the expression of the adrenomedullin and HIF-1 genes in cultured HL-1 cardiomyocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 265(2):382-386.

Nishimori T., Tsujino M., Sato K., Imai T., Marumo F., Hirata Y. ***1997*** Dexamethasone-induced up-regulation of adrenomedullin and atrial natriuretic peptide genes in cultured rat ventricular myocytes. J. Mol. Cell. Cardiol. 29:2125–2130.

Nishikimi T., Horio T., Yoshihara F., Nagaya N., Matsuo H., Kangawa K. ***1998*** Effect of adrenomedullin on cAMP and cGMP levels in rat cardiac myocytes and nonmyocytes. Eur. J. Pharmacol. 353:337-344.

Njuki F., Nicholl C.G., Howard A., Mark J.C., Barnes P.J., Girgis S.I., Legon S. ***1993*** A new calcitonin-like receptor sequence in rat pulmonary blood vessels. Clin. Sci. Colch. 85:385-388.

Nuki C., Kawasaki H., Kitamura K., Takenaga M., Kangawa K., Eto T., Wada A. ***1993*** Vasodilator effect of adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide receptors in rat mesenteric vascular beds. Biochem. Biophys. Res. Commun. 196:245-251.

Oliver K.R., Wainwright A., Heavens R.P., Hil R.G., Sirinathsinghji D.J.S. ***1998*** Distribution of novel CGRP(1) receptor and adrenomedullin receptor mRNAs in the rat central nervous system. Mol. Brain.Res. 57:149-154.

Ono Y., Okano I., Kojima M., Okado K., Kangawa K. ***2000*** Decreased gene expression of adrenomedullin receptor in mouse lung during sepsis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 271(1):197-202.

Owada A., Nonoguchi H., Terada Y., Marumo F., Tomita K. ***1997*** Microlocalization and effects of adrenomedullin in nephron segments and in mesangial cells of the rat. Am. J. Physiol. 272:F691–F697.

Owji A.A., Gardiner J.V., Upton P.D., Mahmoodi M., Ghatei M.A., Bloom S.R., Smith D.M. ***1996*** Characterization and molecular identification of adrenomedullin binding sites in the rat spinal cord: a comparison with calcitonin gene related peptide receptors. J. Neurochem. 67:2172-2179.

Owji A.A., Smith D.M., Coppock H.A., Morgan D.G., Bhogal R., Ghatei M.A., Bloom S.R. ***1995*** An abundant and specific binding site for the novel vasodilator adrenomedullin in the rat. Endocrinology 136:2127-2134.

Padgett C.M., Whorton A.R. ***1995*** Regulation of cellular thiol redox status by nitric oxide. Cell. Biochem. Biophys. 27(3):157-177.

Pfeilschifter J. ***2000*****.** Signalling Pathways of Nitric Oxide. Kidney Blood Press Res. 23:159-161.

Poyner D.R. ***1997*** Molecular pharmacology of receptors for calcitonin gene-related peptide, amylin and adrenomedullin. Biochem. Soc. Trans. 25:1032-1036.

Poyner D.R., Taylor G.M., Tomlinson A.E., Richardson A.G., Smith D.M. ***1999*** Characterization of receptors for calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin on the guinea-pig vas deferens. Br. J. Pharmacol. 126:1276-1282.

Qing X., Svaren J., Keith I.M. ***2001*** M-RNA expression of novel Cgrp1 receptors and their activity-modifying proteins in hypoxic rat lung. Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol. 280(3):L547-L554.

Ratcliffe P.J., Jones R.W., Philips R.E., Nicholls L.G., Bell J.L. ***1990*** Oxygen-dependent modulation of erythropoietin mRNA levels in isolated rat kidneys studied by RNase protection. J. Exp. Med. 172:660-667.

Romppanen H., Marttila M., Magga J., Vuolteenaho O., Kinnunen P., Szokodi I., Ruskoaho H. ***1997*** Adrenomedullin gene expression in the rat heart is stimulated by acute pressure overload: blunted effect in experimental hypertension. Endocrinology. 138:2936-2939.

Sabates B.L., Pigott J.D., Choe E.U., Cruz M.P., Lippton H.L., Hyman A.L., Flint L.M., Ferrara J.J. ***1997*** Adrenomedullin mediates coronary vasodilation through adenosine receptors and KATP channels. J. Surg. Res. 67:163-168.

Sakai K., Saito K., Ishizuka N. ***1998*** Adrenomedullin synergistically interacts with endogenous vasodilators in the rat: a possible role of K-ATP channels. Eur. J. Pharmacol. 359:151-159.

Sakata J., Shimokubo T., Kitamura K., Nakamura S., Kangawa K., Matsuo H., Eto T. ***1993*** Molecular cloning and biological activities of rat adrenomedullin, a hypotensive peptide. Biochem. Biophys. Res. Commun. 195:921-927.

Salceda S., Caro J. ***1997*** Hypoxia-inducible factor 1α (HIF 1α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin proteasome system under normoxic conditions. J. Biol. Chem. 272:22642-22647.

Samson W.K. ***1999*** Adrenomedullin and the control of fluid and electrolyte homeostasis. Annu. Rev. Physiol. 61:363-389.

Samson W.K. ***1998*** Proadrenomedullin-Derived Peptides. Front. Neuroendo. 19:100-127.

Sandau K.B., Fandrey J., Brüne B. ***2001*** Accumulation of HIF-1α under the influence of nitric oxide. Blood. 97(4):1009-1015.

Sandner P., Gess B., Wolf K., Kurtz A. ***1996*** Divergent regulation of vascular endothelial growth factor and of erythropoietin gene expression in vivo. Pflügers Arch. 431:905-912.

Sandner P., Wolf K., Bergmaier U., Gess B., Kurtz A. ***1997*** Induction of VEGF and VEGF receptor gene expression by hypoxia: divergent regulation in vivo and in vitro. Kidney Int. 51:448-453.

Sato K., Imai T., Iwashina M., Marumo F., Hirata Y. ***1998*** Secretion of adrenomedullin by renal tubular cell lines. Nephron. 78:9–14.

Satoh F., Takahashi K., Murakami O., Totsune K., Sone M., Ohneda M., Sasano H., Mouri T. ***1996*** Immunocytochemical localization of adrenomedullin-like immunoreactivity in the human Hypothalamus and adrenal gland. Neurosci. Lett. 203:207-210.

Satoh F., Takahashi K., Murakami O., Totsune K., Sone M., Ohneda M., Abe K., Miura Y., Hayashi Y., Sasano H., Mouri T. ***1995*** Adrenomedullin in human brain, adrenal glands and tumor tissues of pheochromocytoma, ganglioneuroblastoma, and neuroblastoma. J. Clin. Endocrinol.. Metab. 80:1750-1752.

Schobersberger W., Hoffmann G., Fandrey J. ***1996*** Nitric oxide donors suppress erythropoietin production in vitro. Pflügers Arch. 432:980-985.

Schurek H.J. ***1988*** [Kidney medullary hypoxia: a key to understanding acute renal failure]? Klin. Wochenschr. 66(18):828-835.

Sherry B., Schmidtmayerova H., Zybarth G., Dubrovsky L., Raabe T., Bukrinsky M. ***2000*** Nitric oxide regulates MIP-1 alpha expression in primary macrophages and T lymphocytes: implications for anti-HIV-1 response. Mol. Med. 6(6):542-549.

Shimekake Y., Nagata K., Ohta S., Kambayashi Y., Teraoka H., Kitamura K., Eto T., Kangawa K., Matsuo H. ***1995*** Adrenomedullin stimulates two signal transduction pathways, cAMP accumulation and Ca2+ mobilization, in bovine aortic endothelial cells. J. Biol. Chem. 270:4412-4417.

Shoji H., Minamino N., Kangawa K., Matsuo N. ***1995*** Endotoxin markedly elevates plasma concentration and gene transcription of adrenomedullin in rat. 215(2):531-537.

Sogawa K., Numayama-Tsuruta K., Ema M., Abe M., Fujii-Kuriyama Y. ***1998*** Inhibition of hypoxia –inducible factor 1 by nitric oxide donors in hypoxia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95:7368-7373.

Sone M., Takahashi K., Satoh F., Murakammi O., Totsune K., Ohneda M., Sasano H., Ito H., Mouri T. ***1997*** Specific adrenomedullin binding sites in the brain. Peptides 18:1125-1129.

Stark G.R., Kerr I.M., Williams B.R.G., Silverman R.H., Schreiber R.D. ***1998*** How cells respond to interferons. Annu. Rev. Biochem. 67:227-264.

Sugo S., Minamino N., Kangawa K., Miyamoto K., Kitamura K., Sakata J., Eto T., Matsuo H. ***1994A*** Endothelial cells actively synthesize and secrete adrenomedullin [published erratum appears in Biochem. Biophys. Res. Commun. Sep. 15;203(2):1363]. Biochem. Biophys. Res. Commun. 201:1160-1166.

Sugo S., Minamino N., Sohji H., Kangawa K., Kitamura K., Eto T., Matsuo H. ***1995*** Interleukin-1, tumor necrosis factor and lipopolysaccharide additively stimulate production of adrenomedullin in vascular smooth muscle cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 207:25-32.

Sugo S., Minamino N., Shoji H., Kangawa K., Kitamura K., Eto T., Matsuo H. ***1994B*** Production and secretion of adrenomedullin from vascular smooth muscle cells: augmented production by tumor necrosis factor-alpha. Biochem. Biophys. Res. Commun. 203:719–726.

Taichman R.S., Reilly M.J., Matthews L.S. ***2000*** Human osteoblast-like cells and osteosarcoma cell lines synthesize macrophage inhibitory protein 1alpha in response to interleukin 1beta and tumor necrosis factor alpha stimulation in vitro. Br. J. Haematol. 108(2):275-283.

Takahashi K., Satoh F., Hara E., Sone M., Murakami O., Kayama T., Yoshimoto T., Shibahara S. ***1997*** Production and secretion of adrenomedullin from glial cell tumors and its effects on cAMP production. Peptides. 18:1117-1124.

Takahashi K., Satoh F., Sone M., Totsune K., Arihara Z., Noshiro T., Mouri T., Murakami O. ***1998*** Expression of adrenomedullin mRNA in adrenocortical tumors and secretion of adrenomedullin by cultured adrenocortical carcinoma cells. Peptides 19:1719–1724.

Tanaka M., Kitamura K., Ishizaka Y., Ishiyama Y., Kato J., Kangawa K., Eto T. ***1995*** Plasma adrenomedullin in various diseases and exercise-induced change in adrenomedullin in healthy subjects. Intern. Med. 34:728-733.

Togawa M., Haneda M., Araki S., Sugimoto T., Isono M., Hidaka H., Yasuda H., Kashiwagi A., Kikkawa R. ***1997*** Beraprost sodium, an analogue of prostacyclin, induces the expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase and inhibits the proliferation of cultured mesangial cells. Eur. J. Pharmacol. 336:291–294.

Todorov V., Gess B., Godecke A., Wagner C., Schrader J., Kurtz A. ***2000*** Endogenous nitric oxide attenuates erythropoietin gene expression in vivo. Pflügers Arch. 439:445-448.

Tomikawa M., Wang H., Jones M.K., Sugimachi K., Sarfeh I.J., Tarnawski A.S. ***1998*** Expression of adrenomedullin in portal hypertensive gastric mucosa of rats. J. Physiol. Pharmacol. 49:319–328.

Tsuruda T., Kato J., Kitamura K., Kuwasako K., Imamura T., Koiwaya Y., Tsuji T., Kangawa K., Eto T. ***1998*** Adrenomedullin: a possible autocrine or paracrine inhibitor of hypertrophy of cardiomyocytes. Hypertension 31:505–510.

Tuder R.M., Flook E.B., FoelklN.F. ***1995*** Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute and chronic hypoxia. J.Clin. Invest. 95:1798-1807.

Udono T., Takahashi K., Nakayama M., Murakami O., Durlu Y.K., Tamai M., Shibahara S. ***2000*** Adrenomedullin in cultured human retinal pigment cells. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 41(7):1962-1970.

Ueda S., Nishio K., Minamino N., Kubo A., Akai Y., Kangawa K., Matsuo H., Fujimura Y., Yoshioka A., Masui K., Doi N., Murao Y., Miyamoto S. ***1999*** Increased plasma levels of adrenomedullin in patients with systemic inflammatory response syndrome. Am. J. Respir. Crit. Care. Med. 160(1):132-136.

Ueta Y., Kitamura K., Isse T., Shibuya I., Kabashima N., Yamamoto S., Kangawa K., Matsuo H., Eto T., Yamashita H. ***1995*** Adrenomedullin-immunoreactive neurons in the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. Neurosci. Lett. 202:37–40.

Uezono Y., Shibuya I., Ueda Y., Tanaka K., Oishi Y., Yanagihara N., Ueno S., Toyohira Y., Nakamura T., Yamashita H., Izumi F. ***1998*** Adrenomedullin increases intracellular Ca2+ and inositol 1,4,5-triphosphate in human oligodendroglial cell line KG-1C. Brain Res. 786:230-234.

Van-Rossum D., Hanisch U.K., Quirion R. ***1997*** Neuroanatomical localization, pharmacological characterization and functions of CGRP, related peptides and their receptors. Neurosci. Biobehav. Rev. 21:649-678.

Van-Rossum D., Menard D.P., Chang J.K., Quirion R. ***1995*** Comparative affinities of human adrenomedullin 125I-labelled human alpha calcitonin gene-related peptide ([125I]hCGRP alpha) and 125I-labelled Bolton-Hunter rat amylin ([125I]BHrAMY) specific binding sites in the rat brain. Can. J. Physiol. Pharmacol. 73:1084-1088.

Vine W., Beaumont K., Gedulin B., Pittner R., Moore C.X., Rink T.J., Young A.A. ***1996*** Comparison of the in vitro and in vivo pharmacology of adrenomedullin, calcitonin gene-related peptide and amylin in rats. Eur. J. Pharmacol. 314:115-121.

Wang X., Yue T.L., Barone R.C., White R.F., Clark R.K., Willette R.N., Sulpizio A.C., Aiyar N.V., Ruffolog R.R., Feuerstein G.Z. ***1995*** Discovery of adrenomedullin in rat ischemic cortex and evidence for its role in exacerbating focal brain ischemic damage. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92:11480-11484.

Washimine H., Asada Y., Kitamura K., Ichiki Y., Hara S., Yamamoto Y., Kangawa K., Matsuo H., Eto T. 1995 Immunohistochemical identification of adrenomedullin in human, rat, and porcine tissue. Histochem. Cell. Biol. 103:251-254.

Watson M.L., Grix S.P., Jordan N.J., Place G.A., Dodd S., Leithead J., Poll C.T., Yoshimura T., Westwick J. ***1998*** Interleukin 8 and monocyte chemoattractant protein 1 production by cultured human airway smooth muscle cells. Cytokine. 10(5):346-352.

Wenger R.H., Gassmann M. ***1997*** Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1. Biol. Chem. 378:609-616.

Withers D.J., Coppock H.A., Seufferlein T., Smith D.M., Bloom S.R., Rozengurt E. ***1996*** Adrenomedullin stimulates DNA synthesis and cell proliferation via elevation of cAMP in Swiss 3T3 cells. FEBS. Lett. 378:83-87.

Wong J.M., Billiar T.R. ***1995*** Regulation and function of nitric oxide synthase during sepsis and acute inflammation. Adv. Pharmacol. 34:155-170.

Yeung V.T., Ho S.K., Nicholls M.G., Cockram C.S. ***1996*** Adrenomedullin, a novel vasoactive hormone, binds to mouse astrocytes and stimulates cyclic AMP production. J. Neurosci. Res. 46:330-335.

Yoshibayashi M., Kamiya T., Nishikimi T., Saito Y., Matsuo H., Kangawa K. ***1999*** Elevated plasma levels of adrenomedullin in congenital cyanotic heart disease. Clin. Sci. (Colch.). 96(6):543-547.

Zhao L., Brown L.A., Owji A.A., Nunez D.J., Smith D.M., Ghatei M.A., Bloom S.R., Wilkins M.R. ***1996*** Adrenomedullin activity in chronically hypoxic rat lung. Am. J. Physiol. 271(2 Pt 2):H622-9.

Zhao Y., Brandish P.E., DiValentin M., Schelvis J.P., Babcock G.T., Marletta M.A. ***2000*** Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ. Biochemistry. 39(35):10848-10854.

Zhao Y., Hague S., Manek S., Zhang L., Bicknell R., Rees M.C.P. ***1998*** PCR display identifies tamoxifen induction of the novel angiogenic factor adrenomedullin by a non estrogenic mechanism in the human endometrium. Oncogene 16:409–415.

Zhou M., Chaudry I.H., Wang P. ***1999*** Adrenomedullin is upregulated in the heart and aorta during the early and late stages of sepsis. Biochim. Biophys. Acta. 1453(2):273-283.

Zhu H., Bunn H.F. ***1999*** Oxygen sensing and signaling impact of the regulation of physiologically important genes. Respir. Physiol. 115:239-247.

Zaks-Zilberman M., Salkowski C.A., Elsasser T., Cuttitta F., Vogel S.N. ***1998*** Induction of adrenomedullin mRNA and protein by lipopolysaccheride and paclitaxel (Taxol) in murine makrophages. Infect. Immun. 66(10):4669-4675).

Zimmermann U., Fischer J.A., Muff R. ***1995*** Adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide interact with the same receptor in cultured human neuroblastoma SK-N- MC cells. Peptides 16:421-424.

7. Abbkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatcyclase
ADM	Adrenomedullin
ADM-R	Adrenomedullinrzeptor

Aminosäuren:		
A	Ala	Alanin
R	Arg	Arginin
N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat
C	Cys	Cystein
Q	Gln	Glutamin
E	Glu	Glutamat
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
L	Leu	Leucin
K	Lys	Lysin
M	Met	Methionin
F	Phe	Phenylalanin
P	Pro	Prolin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
V	Val	Valin

Abbildung 33: Einbuchstabenschreibweise der Aminosäuren.

APS	Ammoniumpersulfat
AVSMC	aortic vascular smooth muscle cells
bp	Basenpaare
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Co	Kobalt
CO	Kohlenmonoxid
CO_2	Kohlendioxid
cpm	counts per minute
cRNA	copy-Ribonukleinsäure
d	Tag
DAG	Diacylglycerin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EDRF	Endothelium-derived relaxing factor
EDTA	Ethylendiaminotetraacetic acid

EGTA	Ethylenglycol-bis (ß aminoethyl)acid
EIA	Enzym linked Immuno Assay
e-NOS	endotheliale Nitric oxide synthase
EPO	Erythropoetin
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
FCS	Fetales Kälber Serum
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GC	Guanylatcyclase
Gi	inhibitorischer G-Protein gekoppelter Rezeptor
h	Stunde
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HEPES	N-(2 Hydroxyethyl)pirazin-N´-2 ethansulfonsäure
HIF 1(α)	Hypoxia Inducible Factor 1(α)
HP	Hybridisierungspuffer
IBMX	Isobutylmethylxanthin
Il-1ß	Interleukin-1beta
INFγ	Interferon gamma
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase
IP_3	Inositol-1,4,5-triphosphat
JAK-STAT	Janus Kinasen (Protein-Tyrosin-Kinasen), die bestimmte Transkriptionsfaktoren (STAT-Familie) durch Phosphorylierung aktivieren
kDa	kiloDalton
kg	Kilogramm
L	Liter
L-Arg	L-Arginin
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MAPK	mitogen-activated protein kinase
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mol	molar
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
n	Anzahl
N_2	Stickstoff
ng	Nanogramm
nNOS	neuronale Nitric Oxide Synthase
NO	Nitric oxide, Stickstoffmonoxid
O_2	molekularer Sauerstoff
OD	optische Dichte
ODQ	1H-[1,2,4] Oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-one
o.g.	oben genannten
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
p.a.	per analysis
PBS	Phosphate Buffered Saline
pg	Picogramm
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
pmol	Picomolar

RAMP	Receptor activated modifying Protein
RIA	Radio Immuno Assay
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerase chain reaction
S.E.M.	Standardabweichung des Mittelwerts
SD	Sprague-Dawley Ratte
SDS	Sodium dodecyl sulfat
SNAP	S-Nitrosoaminopenicillamin
s.o.	siehe oben
Stabw.	Standardabweichung
STAT	Signaltransducers and Activators of Transkription
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N´,N´,-Tetraethylendiamin
TNFα	Tumor Nekrose Faktor alpha
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
U	Unit
ÜN	über Nacht
usw.	und so weiter
v.	vel
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vs.	versus
Vgl.	Vergleiche
Vol	Volumen
z.B.	zum Beispiel

8. Anhang

Publikationen

Hofbauer K.-H., Jenson B.L., Kurtz A., Sandner P. 2000 Tissue hypoxygenation activates the adrenomedullin system in vivo. Am. J. Physiol. Regulatory Comp. Physiol. 278:R513-R519.

Hofbauer K.-H., Schoof E., Kurtz A., Sandner P. 2001 Inflammatory cytokines stimulate adrenomedullin expression through nitric oxide dependent and independent pathways. Hypertension (Eingereicht).

Lebenslauf

Vor- und Zuname:	Karl-Heinz Hofbauer
Geburtsdatum:	10.02.1970
Geburtsort:	Furth im Wald
Schulausbildung:	Grund- und Teilhauptschule Arnschwang Joseph-von-Fraunhofer Gymnasium Cham
Abitur:	Juni 1989
Grundwehrdienst:	Juli 1989 – Juni 1991 in Roding
Pharmaziestudium:	Oktober 1991 – Oktober 1996 an der Uni Regensburg
Pharmaziepraktikum:	1. Halbjahr: Krankenhausapotheke Barmherzige Brüder in Regensburg 2. Halbjahr: Thurn & Taxis Apotheke in Donaustauf
Approbation als Apotheker:	Dezember 1997
Promotion:	seit Januar 1998 am Lehrstuhl Prof. Dr. Armin Kurtz, Physiologie I an der Universität Regensburg

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe:

Arnschwang, den 11.07.2001 .....