

Aus dem Center for Cardiovascular Research
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Das therapeutische Potential der pharmakologischen Interferenz mit
dem Renin-Angiotensin-System im *in vitro* Modell der diabetischen
Retinopathie

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Marie Horlbeck

aus Berlin

Datum der Promotion: 14.02.2014

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	8
1.1 Epidemiologie der diabetischen Retinopathie	8
1.1.1 Typ 1 Diabetes mellitus.....	8
1.1.2 Typ 2 Diabetes mellitus.....	8
1.2 Klinisches Bild und Stadieneinteilung der diabetischen Retinopathie	8
1.3 Pathogenetische Faktoren der diabetischen Retinopathie	10
1.3.1 Polyolstoffwechsel -Weg.....	10
1.3.2 <i>Advanced Glycation Endproducts</i> (AGEs).....	10
1.3.3 Proteinkinase C.....	11
1.3.4 Hexosaminstoffwechsel.....	11
1.3.5 Oxidativer Stress.....	11
1.4 Das Renin-Angiotensin-System	13
1.4.1 Komponenten.....	13
1.4.1.1 Angiotensin Typ 1 Rezeptor (AT ₁ -Rezeptor).....	14
1.4.1.2 Angiotensin Typ 2 Rezeptor (AT ₂ -Rezeptor).....	14
1.4.2 Das lokale Renin-Angiotensin-System im Auge.....	16
1.5 <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (VEGF) – Mittler zwischen Hyperglykämie, Hypoxie und Gefäßveränderungen	16
1.6 Perizyten	17
1.6.1 Morphologie und Lokalisation der Perizyten.....	17
1.6.2 Funktion der Perizyten und ihre pathophysiologische Bedeutung bei der diabetischen Retinopathie.....	18
1.6.3 Perizytenverlust durch Apoptose.....	19
1.7 Fragestellung	20
2 Material und Methoden	22
2.1 Material	22
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	22
2.1.2 Chemikalien und Substanzen.....	23
2.1.3 Wachstumsmedien.....	24
2.2 Methoden	25
2.2.1 Zellkultur.....	25
2.2.1.1 Isolierung von primären, bovinen, retinalen Perizyten.....	25
2.2.1.2 Kultivierung der Perizyten.....	26

2.2.1.3	Subkultivierung der Perizyten	26
2.2.1.4	Einfrieren von Perizyten.....	26
2.2.1.5	Auftauen von Perizyten	26
2.2.1.6	Charakterisierung der Zellen	27
2.2.1.6.1	Immunfluoreszenz mit <i>Anti-α-Smooth-Muscle-Actin</i> Antikörper	27
2.2.1.6.2	Immunfluoreszenz mit Anti-von-Willebrand-Faktor Antikörper	27
2.2.2	Stimulationsexperimente	28
2.2.2.1	Stimulationsexperimente unter normoglykämischen Bedingungen.....	28
2.2.2.2	Glukosezeitreihen	29
2.2.2.3	Stimulationsexperimente unter hyperglykämischen Bedingungen	29
2.2.2.4	Zellernte	30
2.2.3	Molekularbiologische Methoden.....	31
2.2.3.1	RNA-Isolation	31
2.2.3.2	cDNA Synthese (reverse Transkription)	32
2.2.3.3	Quantitative <i>Real-Time</i> PCR.....	32
2.2.3.3.1	Primer	33
2.2.3.3.2	Durchführung	34
2.2.3.3.3	Auswertung	36
3	Ergebnisse	38
3.1	Primäre, retinale Perizyten vom Rind als Zellkulturmodell.....	38
3.2	Stimulationsexperimente	40
3.2.1	Einfluss von Angiotensin II auf die Expression von Angiogenese-, Inflammations- und Apoptoseparametern in primären, bovinen, retinalen Perizyten	40
3.2.1.1	Genexpression von VEGF nach Behandlung mit Angiotensin II	40
3.2.1.2	Genexpression von IL-6 nach Behandlung mit Angiotensin II.....	41
3.2.1.3	Genexpression von Caspase-3 und Bax nach Behandlung mit Angiotensin II.....	42
3.2.2	Einfluss einer Kultivation unter hyperglykämischen Bedingungen auf die Expression von Angiogenese-, Inflammations- und Apoptoseparametern in primären, bovinen, retinalen Perizyten	44
3.2.2.1	Genexpression von VEGF in primären, bovinen, retinalen Perizyten bei Kultivation unter hyperglykämischen Bedingungen	44
3.2.2.2	Genexpression von IL-6 in primären, bovinen, retinalen Perizyten bei Kultivation unter hyperglykämischen Bedingungen	45
3.2.2.3	Genexpression von Caspase-3 und Bax in primären, bovinen, retinalen Perizyten bei Kultivation unter hyperglykämischen Bedingungen.....	46
3.2.3	Effekte einer pharmakologischen Interferenz mit dem Renin-Angiotensin-System im <i>in vitro</i> Modell der diabetischen Retinopathie	48

3.2.3.1	Einfluss des AT ₁ -Rezeptorantagonisten Candesartan auf die Expression von Angiogenese-, Apoptose- und Inflammationsparametern in primären, bovinen, retinalen Perizyten bei Kultivation unter hyperglykämischen Bedingungen.....	48
3.2.3.1.1	Einfluss von Candesartan auf die Genexpression von VEGF in primären, bovinen, retinalen Perizyten bei Kultivation unter hyperglykämischen Bedingungen.....	49
3.2.3.1.2	Einfluss von Candesartan auf die Genexpression von IL-6 in primären, bovinen, retinalen Perizyten bei Kultivation unter hyperglykämischen Bedingungen.....	50
3.2.3.1.2	Einfluss von Candesartan auf die Genexpression von Caspase-3 und Bax in primären, bovinen, retinalen Perizyten bei Kultivation unter hyperglykämischen Bedingungen	50
3.2.3.2	Einfluss des AT ₂ -Rezeptoragonisten Compound 21 auf die Expression von Angiogenese-, Apoptose- und Inflammationsparametern in primären, bovinen, retinalen Perizyten bei Kultivation unter hyperglykämischen Bedingungen.....	52
3.2.3.2.1	Einfluss von Compound 21 auf die Genexpression von VEGF in primären, bovinen, retinalen Perizyten bei Kultivation unter hyperglykämischen Bedingungen.....	52
3.2.3.2.2	Einfluss von Compound 21 auf die Genexpression von IL-6 in primären, bovinen, retinalen Perizyten bei Kultivation unter hyperglykämischen Bedingungen.....	53
3.2.3.2.3	Einfluss von Compound 21 auf die Genexpression von Caspase-3 und Bax in primären, bovinen, retinalen Perizyten bei Kultivation unter hyperglykämischen Bedingungen	54
4	Diskussion	56
4.1	Einfluss von Angiotensin II auf die Expression von Angiogenese-, Inflammations- und Apoptoseparametern in primären, bovinen, retinalen Perizyten	56
4.1.1	Einfluss von Angiotensin II auf die Expression von VEGF	57
4.1.2	Einfluss von Angiotensin II auf die Expression von IL-6.....	57
4.1.3	Einfluss von Angiotensin II auf die Expression von Caspase-3 und Bax	58
4.2	Die Effekte der Hyperglykämie im <i>in vitro</i> Modell der diabetischen Retinopathie ..	59
4.2.1	Einfluss der Hyperglykämie auf die Expression von VEGF.....	59
4.2.2	Einfluss der Hyperglykämie auf die Expression von IL-6.....	59
4.2.3	Einfluss der Hyperglykämie auf die Expression von Caspase-3 und Bax	60
4.3	Effekte einer pharmakologischen Interferenz mit dem Renin-Angiotensin-System im <i>in vitro</i> Modell der diabetischen Retinopathie	61
4.3.1	Einfluss des AT ₁ -Rezeptorantagonisten Candesartan auf die Expression von Angiogenese-, Inflammations- und Apoptoseparametern in primären, bovinen, retinalen Perizyten bei Kultivation unter hyperglykämischen Bedingungen.....	61
4.3.2	Einfluss des AT ₂ -Rezeptoragonisten Compound 21 auf die Expression von Angiogenese-, Inflammations- und Apoptoseparametern in primären, bovinen, retinalen Perizyten bei Kultivation unter hyperglykämischen Bedingungen.....	64
5	Zusammenfassung.....	67
6	Literaturverzeichnis.....	69
7	Abbildungsverzeichnis.....	78
8	Tabellenverzeichnis.....	80

9	Lebenslauf.....	81
10	Danksagung.....	82
11	Eidesstattliche Versicherung.....	83

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-Konversions-Enzym
AGE	<i>Advanced Glycation Endproduct</i> (Glykierungsendprodukt)
Ang II	Angiotensin II
Apaf-1	Apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1
AT ₁ -R	Angiotensin II Typ 1-Rezeptor
AT ₂ -R	Angiotensin II Typ 2-Rezeptor
Bax	<i>Bcl-2 associated x-protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell- lymphoma</i>
cDNA	Klon DNA
C21	Compound 21
CRP	C-reaktives Protein
C _T	<i>threshold cycle</i>
dH ₂ O	Aqua bidest.
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dsRNA	doppelsträngige RNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	Stickstoffmonooxidsynthethasen
ET1	Endothelin 1
FBS	<i>fetal bovine serum</i> (fötales Kälberserum)
GADPH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HUVEC	Humane Umbilikale Venenendothelzellen
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
IL	Interleukin
IκB	Inhibitor-κB
LBP	Lipopolysaccharid bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MKP-1	<i>mitogen-activated protein kinase phosphatase 1</i>
M-MLV RT	<i>moloney murine leukemia virus reverse transcriptase</i>

mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten RNA)
MW	Mittelwert
n	Probenzahl
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NF- κ B	Nuklear Faktor κ B
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PD	PD 123319 (AT ₂ -Rezeptorantagonist)
PDGF	<i>Plateled Derived Growth Factor</i> (Plättchenwachstumsfaktor)
PKC	Proteinkinase C
PP2A	<i>protein phosphatase 2A</i>
RAS	Renin-Angiotensin-System
RNA	Ribonucleinsäure
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (reaktive Sauerstoffradikale)
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
rtPA	<i>recombinant tissue plasminogen activator</i>
SHP-1	<i>SH2 domain-containing phosphatase</i>
Tab.	Tabelle
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor β</i> (transformierender Wachstumsfaktor β)
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
U	Units
uPAR	Urokinasetyp Plasminogenaktivator Rezeptor
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
VEGF-R	VEGF-Rezeptor
VF	Verdünnungsfaktor

1 Einleitung

Die diabetische Retinopathie ist die häufigste durch mikrovaskuläre Schädigung bedingte Folgeerkrankungen des Diabetes mellitus. In Industrieländern stellt sie die Hauptursache für neu auftretende Erblindung von Erwachsenen im erwerbstätigen Alter dar (Clermont et al., 2006) und betrifft 50-70 % aller Patienten nach mehr als 10-jähriger Diabetesdauer (Klein et al., 1998). Die Gefahr der Erblindung kann zwar durch optimale Blutzuckereinstellung, regelmäßige ophthalmologische Kontrollen und rechtzeitige Therapie mittels Laser eingedämmt, letztendlich aber nicht völlig gebannt werden. Eine zufriedenstellende, gering invasive Therapie der diabetischen Retinopathie existiert bislang nicht.

1.1 Epidemiologie der diabetischen Retinopathie

Die epidemiologischen Daten zur diabetischen Retinopathie variieren je nach Diabetestyp.

1.1.1 Typ 1 Diabetes mellitus

Die Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy (WESDR) stellt eine Prävalenz von ca. 95 % nach 15 bis 20-jähriger Diabetesdauer fest, eine proliferative Retinopathie entwickeln nach 20 Jahren Diabetes mellitus über 50 % der Betroffenen (Klein et al., 1984a). Mittels Fundusphotographie wurde in der Diabetes Control and Complication Trial (DCCT) eine Retinopathie bei 44,4 % der Patienten mit weniger als 5 Jahren Diabetesdauer ermittelt (Malone et al., 2001). Außerdem findet sich nach 15-jähriger Diabetesdauer bei bis zu 15 % der Patienten eine diabetische Makulopathie (Klein et al., 1995).

1.1.2 Typ 2 Diabetes mellitus

Bei 36 % der Typ 2 Diabetiker besteht bei Diagnosestellung bereits eine diabetische Retinopathie (UKPDS Group, 1998). Nach 15 bis 20-jähriger Diabetesdauer findet sich bei 50 % der Betroffenen ohne Insulinbehandlung und bei 80 % der Patienten mit einer Insulinbehandlung eine diabetische Retinopathie (Klein et al., 1984b). Eine Makulopathie zeigt sich bei 25 % nach mehr als 15-jähriger Diabetesdauer (Klein et al., 1995).

1.2 Klinisches Bild und Stadieneinteilung der diabetischen Retinopathie

Die vaskulären Veränderungen bei der diabetischen Retinopathie entwickeln sich schleichend. Alltagsrelevante Symptome treten erst in weit fortgeschrittenen Stadien der Netzhauterkrankung auf. Eine frühzeitige Diagnose ist daher von besonderer Bedeutung.

Erstes morphologisches Zeichen der diabetischen Retinopathie ist der Verlust von Perizyten, gefolgt von der Ausbildung von azellulären Kapillaren, der Entstehung von Mikroaneurysmen und der Verdickung der Basalmembran. Später kommt es zu Kapillarverschlüssen und retinaler Ischämie, die eine Hypoxie-induzierte Neovaskularisierung nach sich ziehen kann. In jedem Stadium kann es durch eine erhöhte Gefäßpermeabilität zu einem Zusammenbruch der Blut-Netzhautschanke mit nachfolgendem Makulaödem kommen (Hammes, 2005).

Man unterscheidet eine nichtproliferative (NPDR) von einer proliferativen diabetischen Retinopathie (PDR) sowie die diabetische Makulopathie. Tabelle 1 zeigt die Stadieneinteilung nach den Leitlinien der Deutschen Diabetes Gesellschaft, den ophthalmologischen Befund und die entsprechenden Therapieempfehlungen bei diabetischer Retinopathie und diabetischem Makulaödem (Hammes et al., 2008).

Tab. 1: Stadieneinteilung, ophthalmologischer Befund und Therapie

Modifiziert nach (Hammes et al., 2008).

Stadium	ophthalmologischer Befund	ophthalmologische Therapie
1.1 nichtproliferative diabetische Retinopathie		
milde Form	Mikroaneurysmen	keine Laserkoagulation
mäßige Form	zusätzlich einzelne intraretinale Blutungen, perlschnurartige Venen (venöse Kaliberschwankungen)	keine Laserkoagulation
schwere Form	„4-2-1-Regel“ > 20 einzelne Mikroaneurysmen, intraretinale Blutungen in 4 Quadranten oder perlschnurartige Venen in 2 Quadranten oder intraretinale mikrovaskuläre Anomalien	Laserkoagulation nur bei Risikopatienten
1.2 proliferative diabetische Retinopathie		
	Papillenproliferation; papillenferne Proliferation	Laserkoagulation
	Glaskörperblutung Netzhautablösung	Laserkoagulation, wenn möglich; sonst eventuell Vitrektomie
2. diabetische Makulopathie		
2.1 fokales Makulaödem	punkt- / fleckförmige Zone(n) von Ödem, harten Exsudaten oder intraretinalen Blutungen am hinteren Pol	keine Laserkoagulation

	wie oben, jedoch makulanah visusbedrohende Sonderform = klinisch signifikantes Makulaödem	gezielte Laserkoagulation
2.2 diffuses Makulaödem	ausgedehntes Ödem der Makula und darüber hinaus mit harten Exsudaten und intraretinalen Blutungen	nur in Ausnahmefällen gitterförmige Laserkoagulation
2.3 ischämische Makulopathie	Diagnose durch Fluoreszenzangiografie: Untergang des perifoveolaren Kapillarnetzes	keine Therapie möglich

1.3 Pathogenetische Faktoren der diabetischen Retinopathie

Neben arterieller Hypertonie (Klein et al., 1989) und hormonellen Umstellungsphasen (Danne et al., 1997; Klein et al., 1990) ist die chronische Hyperglykämie (UKPDS Group, 1998) ein gesicherter kausaler Faktor der diabetischen Mikroangiopathie. Der hyperglykämische Gefäßschaden wird durch verschiedene pathobiochemische Mechanismen hervorgerufen (Brownlee, 2001).

1.3.1 Polyolstoffwechsel -Weg

Die Aldose-Reduktase, das erste Enzym im Polyolstoffwechsel, hat unter physiologischen Bedingungen eine geringe Affinität zu Glukose. Unter hyperglykämischen Situationen kommt es zur Aktivierung des Enzyms, wodurch unter NADPH-Verbrauch Sorbitol gebildet wird. Die Sorbitoldehydrogenase wiederum oxidiert Sorbitol unter Bildung von NADH zu Fruktose. Zu den Konsequenzen, die sich aus der verstärkten Sorbitolbildung ergeben, zählen unter anderem ein Sorbitol induzierter osmotischer Stress für die Zellen, eine verringerte Na⁺/K⁺-ATPase Aktivität, ein erhöhter cytosolischer NADH/NAD⁺ Quotient und ein Abfall des cytosolischen NADPHs.

Aktuelle Studien deuten jedoch auf einen geringen Stellenwert des Aldose-Reduktase-Weges bei der Pathogenese der diabetischen Retinopathie hin. So seien die genannten Veränderungen nicht ausgeprägt genug beziehungsweise können auch durch andere Mechanismen hervorgerufen werden (Brownlee, 2001).

1.3.2 *Advanced Glycation Endproducts* (AGEs)

In diabetischen Retinagefäßen finden sich erhöhte Spiegel an *Advanced Glycation Endproducts* (AGEs) (Stitt et al., 1997). Entscheidende Mechanismen bei der Bildung der AGEs sind die intrazelluläre Autooxidation von Glukose zu Glyoxal, der Abbau von Amadori-Produkten zu

3-Deoxyglukoson und die Fragmentierung von Glyceraldehyd-3-Phosphat zu Methylglyoxal. Diese reaktiven Dikarbonyle reagieren mit den Aminogruppen bestimmter intra- und extrazellulärer Proteine letztendlich zu den AGEs (Thornalley, 1990; Wells-Knecht et al., 1995). Die Zielzellen werden durch die AGEs über drei verschiedene Wege geschädigt. So verändern die durch AGEs modifizierten intrazellulären Proteine ihre Funktion. Die extrazellulären Matrixkomponenten gehen eine veränderte Interaktion mit anderen Matrixkomponenten und Matrix-Rezeptoren ein (Brownlee, 2001). Des Weiteren führt die Interaktion von AGEs mit AGE-Rezeptoren auf Makrophagen, Mesangial- und Endothelzellen zur verstärkten Synthese von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) und über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B indirekt zum programmierten Zelltod von Perizyten und zu einer verstärkten Expression vom *Vascular Endothelial Growth Factor* (Yamagishi et al., 2002) .

1.3.3 Proteinkinase C

Hohe Blutglukosespiegel gehen mit einer vermehrten Bildung von Diacylglycerol (DAG) einher, welches vor allem die Isoformen β und δ der Proteinkinase C (PKC) aktiviert (Koya et al., 1998). Die Aktivierung der PKC bringt durch die Beeinflussung der Expression von Stickstoffmonoxidsynthethasen (eNOS), Endothelin 1 (ET1), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Transforming Growth Factor β* (TGF- β), Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI-1) und durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und der NADPH Oxidase eine Reihe von pathogenetischen Folgen mit sich. Dazu zählen veränderter Blutfluss, erhöhte Gefäßpermeabilität, Angiogenese, Kapillar- und Gefäßkonstriktion sowie die vermehrte Bildung von proinflammatorischen Faktoren (Brownlee, 2001).

1.3.4 Hexosaminstoffwechsel

Das vermehrte Einschleusen von Fruktose-6-Phosphat in den Hexosaminstoffwechsel kann ebenfalls zu diabetischen Komplikationen führen. Durch die Glykosylierung des Transkriptionsfaktors Sp-1 kommt es zu einer verstärkten Expression von TGF- β (Kolm-Litty et al., 1998) und PAI-1, welches unter anderem zu Gefäßokklusionen beiträgt (Du et al., 2000).

1.3.5 Oxidativer Stress

Als gemeinsame Grundlage der zellulären Veränderungen beim Diabetes mellitus kann die Hyperglykämie-bedingte, vermehrte Bildung von Superoxiden in der mitochondrialen Atmungskette angesehen werden (Giugliano et al., 1996). Die daraus folgende Inhibierung des

Enzyms Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GADPH) führt zu einem vermehrten Einschleusen von Metaboliten in den Polyol- und Hexosaminstoffwechsel. Außerdem kommt es zu einer Aktivierung von PKC und Bildung von AGEs (siehe Abb. 1).

Die oben genannten Stoffwechselwege scheinen demnach Folge der Anhäufung von reaktiven Sauerstoffradikalen und Superoxiden in der Atmungskette zu sein (Nishikawa et al., 2000).

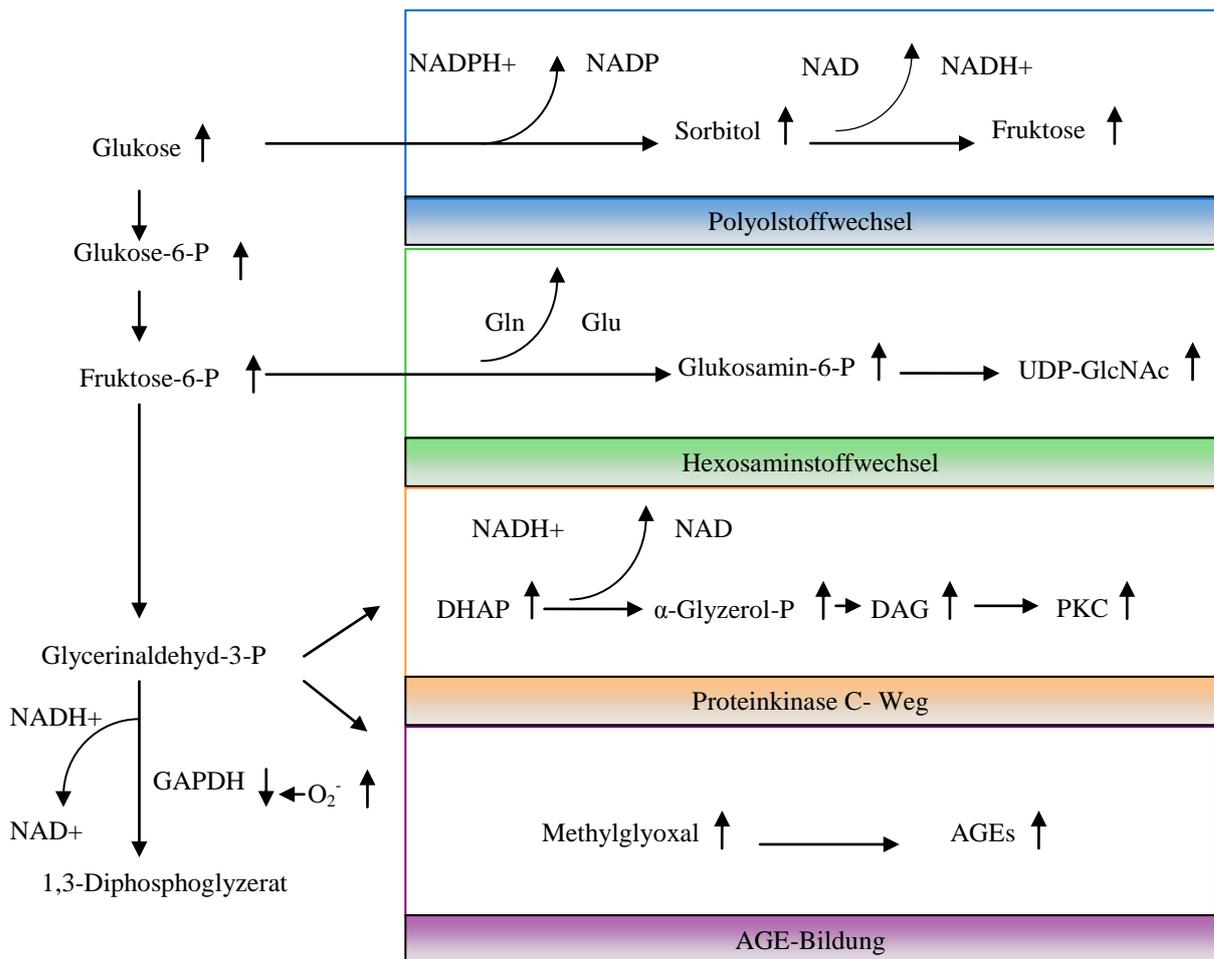


Abb. 1: Potentieller Mechanismus, durch den die Hyperglykämie-induzierte, mitochondriale Überproduktion von Sauerstoffradikalen die vier Wege hyperglykämischer Schädigungen aktiviert.

Modifiziert nach (Brownlee, 2001).

Unter den zahlreichen Faktoren, die an der Pathogenese der diabetischen Retinopathie beteiligt sind, scheint auch das Renin-Angiotensin-System (RAS) eine bedeutende Rolle zu spielen (siehe Abb. 3) (Funatsu et al., 2003).

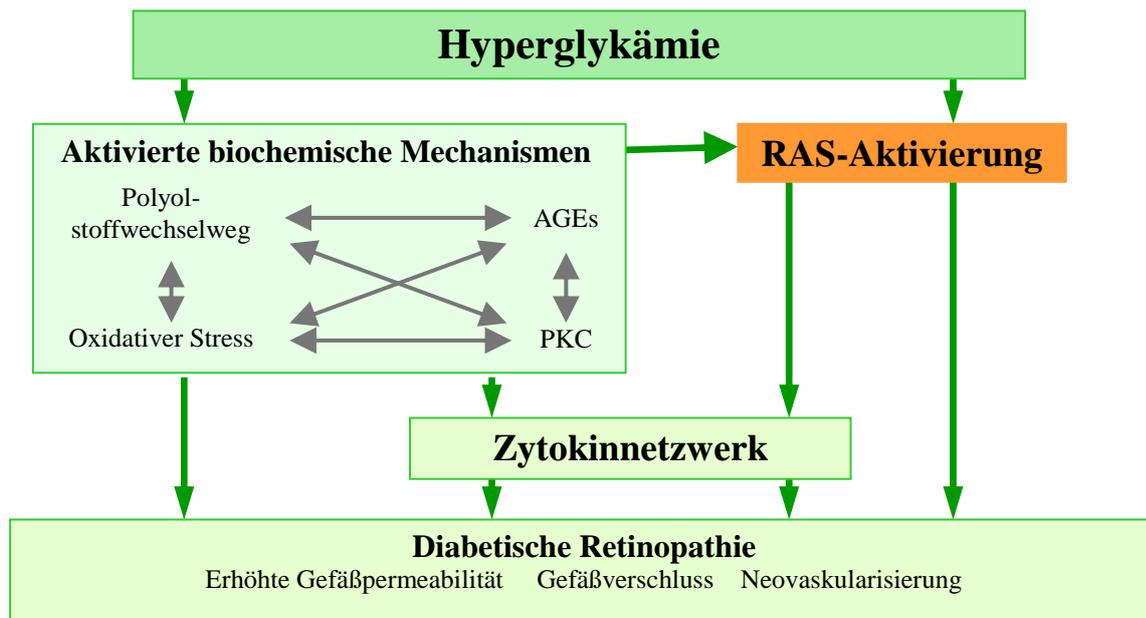


Abb. 2: Pathogenese der diabetischen Retinopathie

Neben verschiedenen anderen biochemischen Mechanismen wird auch das Renin-Angiotensin-System (RAS) durch eine bestehende Hyperglykämie aktiviert. Folge ist die Herausbildung charakteristischer Eigenschaften der diabetischen Retinopathie. Dazu zählen erhöhte Gefäßpermeabilität, Gefäßverschluss und Neovaskularisierung. Modifiziert nach (Funatsu et al., 2003).

1.4 Das Renin-Angiotensin-System

Das Renin-Angiotensin-System ist eines der phylogenetisch ältesten Hormon-Systeme und spielt eine bedeutende Rolle bei der Regulation von Plasmavolumen, Osmolarität und Blutdruck.

Tigerstedt und Bergmann entdeckten 1898 in der Niere eine blutdrucksteigernde Substanz und bezeichneten diese als Renin. Dies legte den Grundstein für die schrittweise Identifizierung der gesamten zur Angiotensin II-Synthese führenden enzymatischen Kaskade (de Gasparo et al., 2000; Steckelings et al., 2005).

1.4.1 Komponenten

Am Anfang des Renin-Angiotensin Systems steht die Freisetzung des Hormons Renin, welches aus Angiotensinogen Angiotensin I abspaltet. Dieses wiederum wird vom Angiotensin-Konversions-Enzym in Angiotensin II umgewandelt. Angiotensin II ist das Hauptwirkhormon des Renin-Angiotensin System und interagiert im Wesentlichen mit 2 Rezeptoren, dem Angiotensin Typ 1 (AT₁) und Angiotensin Typ 2 (AT₂) Rezeptor (de Gasparo et al., 2000) (siehe Abb. 3).

1.4.1.1 Angiotensin Typ 1 Rezeptor (AT₁-Rezeptor)

Der AT₁-Rezeptor gehört zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Er enthält 359 Aminosäuren, sein Gen liegt auf dem Chromosom 3 bei q22. Die Bindung von Angiotensin II führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, welche wiederum eine G-Protein vermittelte Aktivierung von bestimmten Signalkaskaden herbeiführt. Wichtige Enzyme bei der Signaltransduktion sind unter anderem die Phospholipasen C und A2, die Adenylatcyclase und die spannungsabhängige Calciumkanäle vom L- und T-Typ. Weitere AT₁-Rezeptor gekoppelte unabhängig von G-Proteinen verlaufende Signaltransduktionswege sind der Ras-Raf-MAPK-Signaltransduktionsweg und der JAK/STAT-Signalweg, der auch von vielen Zytokinen aktiviert wird. Exprimiert wird der AT₁-Rezeptor von den meisten Geweben, wie unter anderem in Herz, Lunge, Leber, Niere, Prostata, Gefäßen, im Gehirn und Auge (de Gasparo et al., 2000). Er ruft die meisten der bislang von Angiotensin II bekannten physiologischen Wirkungen hervor. Zu den klassischen Funktionen zählen die generalisierte Vasokonstriktion, die Aldosteronfreisetzung aus der Nebennierenrinde sowie die Regulierung des Elektrolythaushaltes, des Zellwachstums und der Proliferation (Otani et al., 2000; Suzuki et al., 2003; Aguilera et al., 1996). Außerdem ist der AT₁-Rezeptor beteiligt an der Herausbildung arteriosklerotischer Veränderungen, an der Pathogenese von Nierenerkrankungen und bei der Tumorgenese (Kim et al., 2000; Gilbert et al., 2003).

1.4.1.2 Angiotensin Typ 2 Rezeptor (AT₂-Rezeptor)

Der AT₂-Rezeptor weist ebenfalls die für die G-Protein gekoppelten Rezeptoren charakteristischen sieben transmembranären Domänen auf, zeigt aber nur eine 32-34-prozentige Sequenzübereinstimmung mit dem AT₁-Rezeptor. Ob der AT₂-Rezeptor über G-Protein-Kopplung signalisiert, ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Er besteht aus 363 Aminosäuren, das codierende Gen liegt auf dem X Chromosom bei q22-q23 (Wright et al., 2008). Die Entschlüsselung der Signalwege des AT₂-Rezeptors erweist sich komplizierter als die des AT₁-Rezeptors. Die Stimulation des AT₂-Rezeptors führt zur Aktivierung verschiedener Protein-Phosphatasen (*mitogen-activated protein kinase phosphatase 1* (MKP-1), *SH2 domain-containing phosphatase* (SHP-1) und *protein phosphatase 2A* (PP2A)), des NO/cGMP –Systems und zur Stimulierung der Phospholipase C (Nouet et al., 2000). Im fetalen Gewebe dominiert der AT₂-Rezeptor. Postnatal sinkt seine Expression drastisch ab und beschränkt sich auf ein paar wenige Organe wie Gehirn, Herz, Niere, Myometrium, Nebennieren und Ovarien (Grady et al., 1991; de Gasparo et al., 2000). Allerdings kommt es unter pathologischen Situationen, insbesondere bei Prozessen mit Gewebszerstörungen, zu einer verstärkten Expression des AT₂-

Rezeptors (Steckelings et al., 2005). Der AT₂-Rezeptor scheint ein Modulator wichtiger und komplexer biologischer Programme zu sein, zu denen sich embryologische Entwicklung, Zelldifferenzierung, Apoptose, Regulierung der Nierenfunktion und Blutdruck zählen lassen (Carey et al., 2000; de Gasparo et al., 2000). In verschieden *in vivo* und *in vitro* Studien wurde gezeigt, dass eine Stimulation des AT₂-Rezeptors zu antiproliferativen Effekten führen kann (Stoll et al., 1995; Meffert et al., 1996a; Fischer et al., 2001; Levy et al., 1996; Munzenmaier et al., 1996). Zudem spielt der AT₂-Rezeptor eine wichtige Rolle beim „Remodeling“ von kardiovaskulären Geweben nach einem Herzinfarkt oder Hypertonie (Wu et al., 2002, 2001). Des Weiteren leistet der AT₂-Rezeptor einen wichtigen Beitrag bei der Regeneration nach Nervenschädigungen (Lucius et al., 1998; Rosenstiel et al., 2002; Iwai et al., 2004). So scheint die in Studien beobachtete vermehrte Expression des AT₂-Rezeptors nach einem Schlaganfall (Makino et al., 1996; Li et al., 2005), nach Durchtrennung des Ischiasnervs (Gallinat et al., 1998; Reinecke et al., 2003), bei Chorea Huntington oder Alzheimer (Ge et al., 1996) einen positiven Einfluss auf die Nervenregeneration auszuüben.

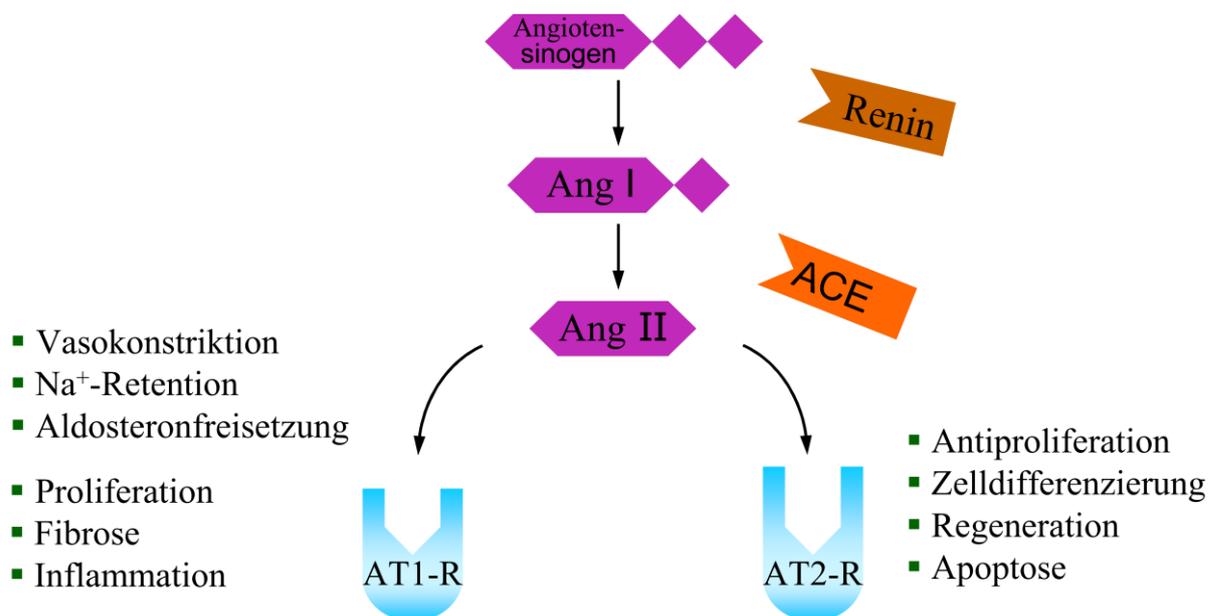


Abb. 3: Das Renin-Angiotensin-System

Angiot: Angiotensinogen; Ang: Angiotensin; ACE: Angiotensin-Konversions-Enzym; AT1-R: Angiotensin Rezeptor Typ 1; AT2-R: Angiotensin Rezeptor Typ 2;
Modifiziert nach (Unger et al., 1996).

1.4.2 Das lokale Renin-Angiotensin-System im Auge

Neben dem klassischen systemischen Renin-Angiotensin-System gibt es auch sogenannte lokale Renin-Angiotensin-Systeme. Diese wurden bereits für die Nebenniere, das Herz, den Thymus und für die Gefäße beschrieben. Immer mehr Studien sprechen aber auch für die Existenz eines lokalen Systems im Auge (Strain et al., 2002). So konnten alle wichtigen Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems im Auge identifiziert werden. Die Idee vom lokalen System wird auch dadurch bestärkt, dass die lokale Menge an Angiotensin II im Auge wesentlich höher als die im Serum ist. Erhöhte Spiegel an Prorenin, Renin und Angiotensin fanden sich bei Patienten mit proliferativer diabetischer Retinopathie und diabetischem Makulaödem (Funatsu et al., 2002; Danser et al., 1994). Man geht sogar davon aus, dass die Höhe der Spiegel mit dem Grad der diabetischen Retinopathie korreliert (Wilkinson-Berka, 2006). Mögliche physiologische Funktionen von Angiotensin II im Auge stellen die Regulation von intraokularem Blutfluss und Druck dar. Des Weiteren erhöht Angiotensin II die Gefäßpermeabilität und den oxidativen Stress im Auge und kann in einen engen Zusammenhang mit der intraokulären Angiogenese gebracht werden (Funatsu et al., 2003).

1.5 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) – Mittler zwischen Hyperglykämie, Hypoxie und Gefäßveränderungen

Studien belegen, dass Hyperglykämien *in vivo* oder erhöhte Glukosekonzentrationen *in vitro* die Bildung von vasoaktiven Faktoren induzieren (Chakrabarti et al., 2000). Unter diesen Faktoren kann VEGF als bedeutender Mediator bei der Entstehung diabetischer Gefäßveränderungen angesehen werden (siehe Abb. 4) (Miller et al., 1997). Infolge alternativen Splicings oder Degradation der Primär-RNA gehören der VEGF Familie 5 verschiedene Glykoproteine an: VEGF-A (einige Isoformen mit z.B. 121, 145, 165 183, 189 oder 206 Aminosäuren), -B, -C, -D, und -E (Ferrara, 2004; McMahon, 2000). VEGF-A (auch als VEGF bezeichnet) wurde als erstes beschrieben und ist das best erforschte Mitglied der VEGF-Familie. Verschiedenste Zellen, unter anderem retinale Pigmentepithelzellen, Perizyten, Astrozyten, Müllerzellen und Endothelzellen, sind in der Lage, VEGF zu exprimieren (Adamis et al., 1993; Simorre-Pinatel et al., 1994; Behzadian et al., 1998). Dabei erhöhen Hypoxie, oxidativer Stress und Hyperglykämie seine Expression. VEGF interagiert mit den zwei spezifischen Tyrosin-Kinase-Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2, die vorwiegend auf vaskulären Endothelzellen lokalisiert sind. Die beiden Rezeptoren unterscheiden sich in ihrer biologischen Funktion. VEGFR-1 spielt eine Rolle bei der Zellmigration, VEGFR-2 induziert die Endothelzellproliferation und ist bei den

Phosphatidylinositol 3'-Kinase vermittelten antiapoptotischen Prozessen beteiligt. (Caldwell et al., 2003).

VEGF führt am Endothel zu einer Reihe von Reaktionen: Endothelzellproliferation, Angiogenese, Vasodilatation und Hypermerbeabilität (Ferrara, 2004).

So belegen Studien die Korrelation zwischen einer verstärkten Expression von VEGF und einem sich herausbildenden Permeabilitätsdefekt (Qaum et al., 2001). Die Ursache scheint in der Unterbrechung der endothelialen Zellkontakte durch die VEGF-induzierte uPAR (Urokinasetyp Plasminogenaktivator Rezeptor) Expression zu liegen (El-Remessy et al., 2003). Auch konnte eine Diabetes-induzierte Permeabilitätssteigerung *in vivo* mittels Hemmung der VEGF-Expression verhindert werden (Joussen et al., 2002).

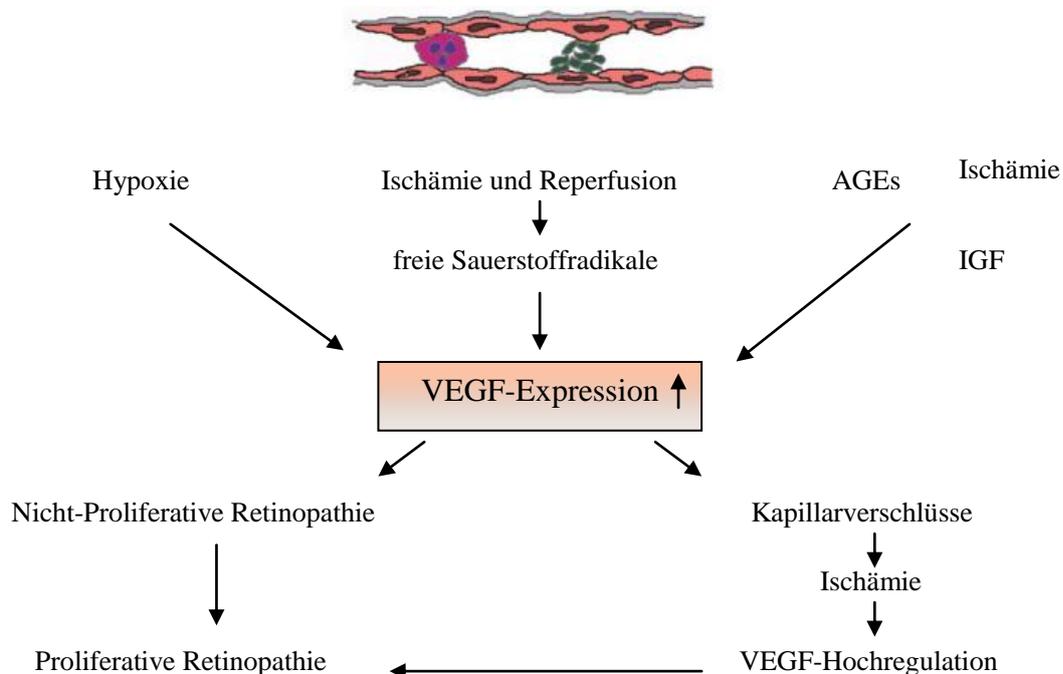


Abb. 4: VEGF – ein bedeutender pathogener Faktor der diabetischen Retinopathie

Diabetesassoziierte Veränderungen wie Hypoxie oder AGEs aktivieren die Expression des Wachstumsfaktors VEGF. Er gehört zu den wichtigsten Mediatoren zwischen nichtproliferativen und proliferativen Formen der diabetischen Retinopathie.

Modifiziert nach (Joussen et al., 2003).

1.6 Perizyten

1.6.1 Morphologie und Lokalisation der Perizyten

Vor ungefähr 100 Jahren wurde erstmalig von Eberth und Rouget der Zelltyp der perivaskulären Zellen beschrieben. Zimmermann führte schließlich den Fachausdruck „Perizyten“ ein. Er beschrieb sie als sich an Kapillaren anlagernde, in einer großen Vielzahl von Geweben

verschiedener Spezies vorkommende Zellen (Hirschi et al., 1996). Ihr Zellkörper, von dem sich lange Fortsätze herausstrecken, besteht aus einem prominenten Zellkern, umgeben von einem schmalen Zytoplasma. Zellkörper und Fortsätze sind in die Basalmembran eingeschlossen. Die Fortsätze der Perizyten können die Basalmembran durchbrechen, um zum darunter liegenden Endothel Kontakt aufzunehmen und umgekehrt (Allt et al., 2001).

Die Anzahl der Perizyten variiert in verschiedenen Geweben und zwischen unterschiedlich großen Gefäßen. Dabei weisen Retinagefäße den höchsten Perizytenanteil auf (Motiejūnaite et al., 2008). So sind bei der Ratte 41 % der retinalen Kapillarfläche mit Perizyten bedeckt, wohingegen im Cerebrum nur 22-32 %, im Skelettmuskel 21 % und im Herzmuskel nur 11 % der Kapillarfläche mit Perizyten ummantelt sind (Sims, 1991).

1.6.2 Funktion der Perizyten und ihre pathophysiologische Bedeutung bei der diabetischen Retinopathie

Perizyten weisen vielfältige Funktionen auf. Die Möglichkeit zur Kontraktion und Relaxation verleiht ihnen die Fähigkeit, bei der Regulation des Blutflusses mitzuwirken (Edelman et al., 2006). Mikrofilamente, die eine wichtige Rolle bei der Kontraktion spielen, wie Aktin, Myosin, Tropomyosin und die GMP-abhängige Proteinkinase konnten in den Perizyten nachgewiesen werden (Joyce et al., 1985a, 1985b).

Während der Gefäßentwicklung kontrollieren Perizyten sowohl die Gefäßbildung als auch den Gefäßumbau. *In vivo* Experimente deuten daraufhin, dass eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren (VEGF, Angiopoietine, PDGF-B und TGF- β) bei der Ausreifung von Retinagefäßen beteiligt sind (Hammes, 2005). Dabei werden die Perizyten über den Faktor PDGF-B rekrutiert. Dieser Wachstumsfaktor wird vom Endothel, der entsprechende Rezeptor PDGFR- β von den Perizyten selbst gebildet. Dies lässt auf eine parakrine Interaktion zwischen den zwei Zelltypen schließen. Die Abwesenheit von einem PDGF-B Allel bei Knockout-Mäusen führt zu einem Perizytenverlust und einem signifikanten Anstieg von azellulären Kapillaren (Ejaz et al., 2008). Das Gefäßsystem ohne Perizyten weist dann ähnliche Merkmale auf wie das der diabetischen Retina: Mikroaneurysmen, Ödeme und Hämorrhagien. Auch unterstreicht eine Verringerung der PDGF-B Expression bei diabetischen Mäusen die mögliche Rolle von PDGF-B beim Perizytenchwund (Motiejūnaite et al., 2008).

Erstes morphologisches Zeichen der diabetischen Retinopathie ist der Verlust an Perizyten, der eine endotheliale Dysfunktion nach sich zieht. Destabilisierung, Funktionseinschränkung und geringerer Widerstand der Gefäße gegenüber metabolischem Stress sind die Folge. Typische Zeichen der nichtproliferativen diabetischen Retinopathie bilden sich aus. Studien belegen, dass

das von Perizyten produzierte TGF- β die Migration und Proliferation von Endothelzellen inhibiert, ein Perizytenverlust kann somit eine Endothelzellproliferation fördern (Orlidge et al., 1987; Barnard et al., 1990). Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass eine Abnahme von Perizyten nicht nur zu vasodynamischen Änderungen, sondern auch zu Neovaskularisierungserscheinungen bei der proliferativen diabetischen Retinopathie führt (siehe Abb. 5).

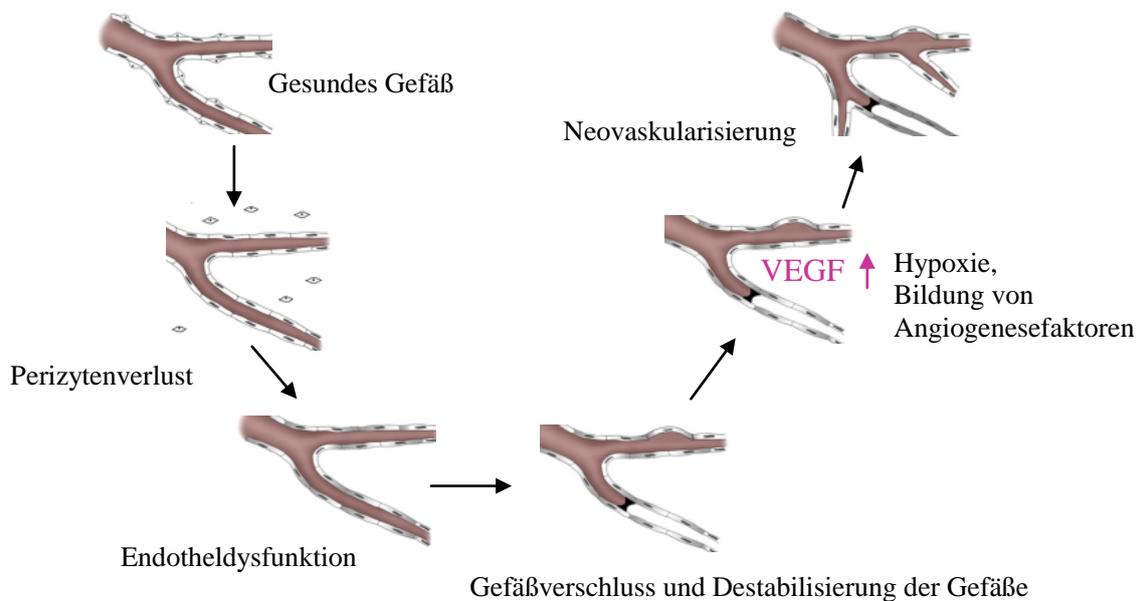


Abb. 5: Die Entwicklung von charakteristischen Gefäßveränderungen bei der diabetischen Retinopathie
Modifiziert nach (Motiejūnaite et al., 2008).

1.6.3 Perizytenverlust durch Apoptose

Untersuchungen verdeutlichen, dass Perizyten der diabetischen Retina durch Apoptose zu Grunde gehen (Mizutani et al., 1996a). Als Ursachen werden eine erhöhte Aktivität des Polyolstoffwechsels, des lokalen Renin-Angiotensin-Systems, eine AGE-Akkumulation und Oxidativer Stress angesehen (Motiejūnaite et al., 2008).

In der Wissenschaft versteht man unter dem Begriff Apoptose, welcher 1972 von Kerr und Mitarbeitern zur Abgrenzung gegenüber der Nekrose eingeführt wurde, den physiologisch programmierten Zelltod (Hiramine, 1997). Unterschiedliche Stimuli können zum gesteuerten Untergang der Zelle führen. Der Vorgang der Apoptose lässt sich in eine Initiationsphase und eine Exekutionsphase unterteilen. Die Initiationsphase kann über den extrinsischen Signalweg, initiiert über Todesrezeptoren wie TNF (Tumor-Nekrose-Faktor) und CD95 (Fas/APO-1) oder dem intrinsischen Signalweg, bei dem die Mitochondrien eine wichtige Rolle spielen, aktiviert werden (Reed, 2000). Hyperglykämien induzieren in der mitochondrialen Atmungskette eine chronische Überproduktion von Superoxiden, welche die DNA und Lipidmembran der

Mitochondrien schädigen (Kowluru, 2005). So wurde in diabetischen Mäusen eine Schwellung von Mitochondrien beobachtet (Kanwar et al., 2007). Bei einer Dominanz von proapoptotischen Proteinen wird schließlich die mitochondriale Membran permeabilisiert, wodurch mitochondriale Proteine wie z.B. Cytochrom C ins Zytosol freigesetzt werden (Kowluru et al., 2007). Zusammen mit Apaf-1 (apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1) und Procaspase-9 bildet Cytochrom C das sogenannte Apoptosom. Die Initiator-Caspase-9 wird aktiviert und prozessiert daraufhin Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6, -7), welche zu den apoptotisch bedingten metabolischen Veränderungen der Zelle führen (Pop et al., 2006).

Ein anderer apoptotischer Vermittler der Perizyten ist der Transkriptionsfaktor NF- κ B, der unter diabetischer Stoffwechsellage ebenfalls aktiviert wird (Kowluru et al., 2003). Dabei moduliert NF- κ B die Expression von proinflammatorischen Faktoren (Schreck et al., 1992).

1.7 Fragestellung

Neben Hypertonie (Klein et al., 1989), chronischer Hyperglykämie (UKPDS Group, 1998) und hormonellen Umstellungsphasen (Danne et al., 1997; Klein et al., 1990) scheint auch das Renin-Angiotensin-System (RAS) eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung diabetischer Gefäßveränderungen zu spielen (Funatsu et al., 2003). Ein lokales RAS im Auge beziehungsweise der Retina (Strain et al., 2002) trägt in diesem Zusammenhang vermutlich zu erhöhten Spiegeln an Prorenin, Renin und Angiotensin II in den Glaskörpern von Patienten mit proliferativer diabetischer Retinopathie und Makulaödem bei (Danser et al., 1989). Ergebnisse aus *in vivo*-Experimenten deuten darauf hin, dass die Blockade des Renin-Angiotensin-Systems mit ACE-Hemmern oder AT₁-Rezeptorblockern günstige Auswirkungen auf die diabetische Retinopathie hat (Wilkinson-Berka, 2006). In einer internationalen klinischen Studie (DIRECT – „The DIabetic RETinopathy Candesartan Trials Programme“) wurde die Wirkung einer vorbeugenden Therapie mit dem AT₁-Blocker Candesartan auf das Voranschreiten der diabetischen Retinopathie unter Einschluss von über 5000 Patienten untersucht (Chaturvedi et al., 2002). Dabei konnte die Inzidenz einer diabetischen Retinopathie bei normotensiven Typ 1 Diabetikern durch die Behandlung mit Candesartan reduziert werden. Bei normo- und hypertensiven Typ 2 Diabetikern führte die Behandlung zu einer Regression bei schon bestehender Retinopathie (Chaturvedi et al., 2008; Sjølie et al., 2008). Die einer möglichen protektiven Wirkung der AT₁-Rezeptorblocker zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen sind jedoch bisher kaum verstanden. Welches therapeutische Potential dem AT₂-Rezeptor bei der diabetischen Retinopathie zukommt ist noch unzureichend geklärt.

Da Perizyten maßgeblich an frühen pathologischen Veränderungen in der Retina bei diabetischer Retinopathie beteiligt sind, sollte in den hier beschriebenen Versuchen an bovinen Perizyten *in vitro* untersucht werden, inwieweit sich Hyperglykämie-bedingte Veränderungen in Perizyten durch Behandlung mit AT₁-Rezeptorblockern oder AT₂-Rezeptoragonisten therapeutisch beeinflussen lassen. Dabei untersuchten wir die Genexpression von Markern, deren Bedeutung bei der diabetischen Retinopathie bekannt ist. Hierzu wählten wir den angiogenen Wachstumsfaktor VEGF, das pro-entzündliche Interleukin-6 sowie die Apoptosemarker Caspase-3 und Bax.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Analysenwaage	Sartorius, Göttingen, D
Feinwaage	Sartorius, Göttingen, D
Inkubator HERAcell 150	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Klebefolie, optisch klar	Sarstedt, Nümbrecht, D
Kühlzentrifuge Mikro 22R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, D
Lichtmikroskop Leica DM IL	Leica, Wetzlar GmbH, Frankfurt a.M., D
Mikroskop Leica DM IRE2	Leica, Wetzlar GmbH, Frankfurt a.M., D
Mini-Zentrifuge	neo-Lab, Heidelberg, D
NanoDrop R Spectrometer ND-1000	peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
PCR-Maschine Mx 3000P™	Stratagene, La Jolla, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, D
Tischzentrifuge Mikro 20, Typ 2004	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, D
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg, D
10 ml BD Discardit™ II Spritze mit LUER- Ansatz	BD Biosciences, Heidelberg, D
96 Well Multiply® – PCR Platte	Sarstedt, Nümbrecht, D
Zellkulturzubehör	
Anatomische Pinzette	Medi – King, Oyten, D
Chirurgische Schere	Medi – King, Oyten, D
Cellulose-Acetat-Filter	Whatman, Dassel, D
Chirurgische Pinzette	Medi – King, Oyten, D
Eppendorfgefäße	Eppendorf, Hamburg, D
Homogenisator mit Teflon Pistill Potter Elvehjem	Mercateo AG, München, D
Serologische Pipetten	Nunc, Wiesbaden, D
T-Flaschen (25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²)	Sarstedt, Newton, USA
Zellkulturplatten (div. Größen)	Sarstedt, Newton, USA
Zellschaber 24 cm	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, CH
Zentrifugengefäße (Falcon)	BD Biosciences, Heidelberg, D

2 ml-Kryoröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, D
10 µl-, 100 µl-, 1000 µl -Eppendorfspitzen	Eppendorf, Hamburg, D
2.1.2 Chemikalien und Substanzen	
Angiotensin II, human	Sigma, Steinheim, D
<i>Anti-von-Willebrand-Factor antibody produced in rabbit</i>	Sigma, Steinheim, D
Antikörper Cy3 Goat Anti-Rabbit	Dianova, Hamburg, D
Compound 21	Vicore Pharma, Göteborg, S
Candesartan	Takeda Pharmaceutical Company Limited, Osaka, J
Collagenase/Dispase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
DAPI	Boehringer, Mannheim, D
D-(+)-Glucose	Sigma, Steinheim, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Steinheim, D
Donkey Serum	Biocompare, San Francisco, USA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) - low glucose	Sigma, Steinheim, D
Ethanol	J. T. BAKER, Deventer, NL
Fluorescence Mounting Medium	Dako, Hamburg, D
Fötale Kälberserum (FBS)	Gibco TM Invitrogen, Karlsruhe, D
L-alanyl-L-glutamin, 200 mM	Biochrom AG, Berlin, D
Methanol	Merck, Darmstadt, D
M-MLV Revesere Transkriptase	Promega, Mannheim, D
<i>Monoclonal Anti-α-Smooth-Muscle-Actin -FITC antibody produced in mouse</i>	Sigma, Steinheim, D
PD 123319	Sigma, Steinheim, D
Penicillin-Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, D
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Power SYBR Green® Mastermix	Applied Biosystems, Foster City, USA
Random Primers	Promega, Mannheim, D
RNase-Zap	Sigma, Steinheim, D
rRNasin RNase Inhibitor	Promega, Mannheim, D

Set of dATP, dGTP, dCTP, dTTP	Promega, Mannheim, D
Triton X 100	Sigma, Steinheim, D
Trypsin / EDTA (1x)	PAA Laboratorics GmbH, Pasching, D
Ultra Pure Water	Biochrom AG, Berlin, D

NucleoSpin RNAII-Kit	Machery-Nagel, Düren, D
----------------------	-------------------------

2.1.3 Wachstumsmedien

Wachstumsmedium M1 (20 % FBS)	400 ml DMEM - low glucose 100 ml FBS 10 ml L-alanyl-L-glutamin, 200 mM 5 ml Penicillin-Streptomycin
Wachstumsmedium M2 (10 % FBS)	450 ml DMEM - low glucose 50 ml FBS 10 ml L-alanyl-L-glutamin, 200 mM 5 ml Penicillin-Streptomycin
Hungermedium	500 ml DMEM - low glucose 10 ml L-alanyl-L-glutamin, 200 mM 5 ml Penicillin-Streptomycin

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

In der vorliegenden Arbeit wurden *in vitro* Experimente mit aus der Retina von Rinderaugen isolierten Perizyten durchgeführt. Das Zellmodell wurde im Rahmen dieser Arbeit im Center for Cardiovascular Research in Berlin erstmals etabliert, da dort bis dato noch keine primären, bovinen, retinalen Perizyten Verwendung gefunden hatten.

Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.2.1.1 Isolierung von primären, bovinen, retinalen Perizyten

Die Zellisolierung erfolgte in Anlehnung an die beschriebenen Methoden von Wong et al. und McItosh et al. (McIntosh et al., 1988; Wong et al., 1987).

Es wurde ausschließlich mit sterilen Instrumenten und Hilfsmitteln gearbeitet.

Etwa 20 Augen von frisch geschlachteten Rindern wurden gekühlt auf Eis vom Schlachthof zum Labor transportiert. Die Augen wurden nach der E nukleation maximal 24 Stunden bei 4 °C aufbewahrt. Die Präparation erfolgte unter einer sterilen Zellkulturbank. Zunächst wurden die Augen von Fett und Bindegewebe befreit und zur Desinfizierung des äußeren Gewebes in ein mit verdünntem Sterillium gefülltes Becherglas gegeben. Nach anschließender Reinigung mit sterilem PBS, wurden die Augen in spezielle sterile Halter hineingesetzt. Mit Hilfe eines Skalpells wurden die Augen dicht hinter dem Limbus (Übergangszone zwischen Horn- und Lederhaut des Augapfels) aufgeschnitten, der Glaskörper herausgenommen und schließlich die Neuroretina mit Hilfe von Pinzetten vom darunter liegendem Pigmentepithel abgelöst. Jeweils 10 Retinae wurden in ein Gefäß gefüllt mit 20 ml Hungermedium zwischengelagert. In einem nächsten Schritt wurden die Retinae in einen Teflonhomogenisator überführt, um durch Auf- und Abbewegen des Kolbens eine Mikrogefäß suspension zu erzeugen. Diese Mikrogefäß suspension wurde mit einer 20 ml Spritze aufgenommen und durch einen Metallfilter, der ein Nylon-Netz (Porengröße 85µm) enthielt, filtriert. Der Nylonfilter wurde in eine Petrischale mit 10 ml Hungermedium und 10 mg Collagenase/Dispase gelegt, die vom Netz gefangenen Mikrogefäße mit einem sterilen Zellschaber heruntergeschabt und schließlich im Brutschrank für 30 Minuten bei 37 °C, 95 % O₂, 5 % CO₂ inkubiert. Während der Inkubation wurde die Petrischale alle 10 Minuten geschwenkt. Im Anschluss wurde der Inhalt der Petrischale auf ein 15 ml Falcon überführt und 8 Minuten bei 1200 rpm und 24 °C zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen, das Pellet in 2 ml Wachstumsmedium M1 resuspendiert und in eine 75 cm² Kulturflasche, in der schon 10 ml Wachstumsmedium M1 vorlagen, überführt. Nach 24 Stunden im Begasungsbrutschrank bei 37 °C, 95 % O₂ und 5 % CO₂ wurde das alte Medium der Zellen

abgesaugt und die Zellen erneut mit 12 ml 37 °C warmen frischen Wachstumsmedium M1 versetzt.

2.2.1.2 Kultivierung der Perizyten

Die meisten Zellen bildeten nach kurzer Zeit große flache, irregulär begrenzte Zellkörper mit dünnen langen Zytoplasmafortsätzen aus und hefteten sich am Boden der Schale fest. Dicht benachbart liegende Zellen schienen teilweise über die dünnen Zytoplasmafortsätze Kontakte auszubilden. Um eine gute Entwicklung der Zellen zu gewährleisten, wurde das Medium alle 3 Tage gewechselt.

2.2.1.3 Subkultivierung der Perizyten

Sobald die Zellen konfluent waren, wurden sie subkultiviert. Das Medium M1 wurde abgesaugt und die Zellen mit 37 °C warmen PBS gewaschen. Zum Ablösen der Perizyten wurden 2 ml 0,1 % Trypsin-EDTA-Lösung hinzugegeben und die 75 cm² Kulturflasche sofort bei 37 °C in den Inkubator gestellt. Nach einigen Minuten konnte das Ablösen der Zellen unter dem Mikroskop beobachtet werden. Daraufhin wurden 5 ml Wachstumsmedium M1 zu den in der Trypsinlösung gelösten Zellen gegeben, das gesamte Volumen in ein 15 ml Falcon überführt und im Anschluss 5 min bei 1000 rpm und 24 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 5,5 ml frischem Medium M1 resuspendiert, um je 1,5 ml Zellsuspension auf 3 neue 75 cm² Kulturflaschen, in denen je 10,5 ml Medium M1 vorgelegt waren, zu verteilen. In den Versuchen wurden Kulturen von der zweiten bis zur vierten Passage verwendet. Ab der zweiten Passage enthielt das Medium nur noch 10 % FBS (Wachstumsmedium M2).

2.2.1.4 Einfrieren von Perizyten

Die Zellen einer Kulturflasche wurden trypsiniert, in 5 ml Medium aufgenommen und zentrifugiert (5 min, 1000 rpm, 24 °C). Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in Einfriermedium (4,75 ml FBS und 250µl DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen gegeben. Diese wurden zunächst bei -80 °C und später in Flüssigkeitsstickstoff gelagert.

2.2.1.5 Auftauen von Perizyten

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen im 37 °C warmen Wasserbad erwärmt. Dabei war darauf zu achten, die Zellen so kurz wie nur möglich mit dem toxischen Einfriermedium in Kontakt zu belassen. Die Zellsuspension wurde in ein vorbereitetes, mit Zellkulturmedium M2 gefülltes Falcon überführt, das Medium M2 abzentrifugiert (5 min, 1000

rpm, 24 °C), der Überstand verworfen und das Pellet in 2 ml Medium M2 resuspendiert. Nun konnte die Zellsuspension auf eine neue Kulturflasche ausgesät werden. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

2.2.1.6 Charakterisierung der Zellen

Zur Abgrenzung der isolierten Zellen gegenüber Endothelzellen und sicheren Identifizierung als Perizyten wurden verschiedene Methoden angewandt. Das Wachstumsverhalten und die Morphologie der isolierten Zellen wurden täglich unter dem Lichtmikroskop verfolgt. Zur Dokumentation wurden Lichtbildaufnahmen angefertigt. Die indirekte Immunfluoreszenz stellte eine weitere Methode zur Charakterisierung dieser Zellen dar. Über den Nachweis von α -Aktin und über die fehlende Anfärbbarkeit mit Anti-von-Willebrand-Faktor Antikörpern erfolgte die Identifizierung der Zellen. Endothelzellen (HUVEC, Humane Umbilikale Venenendothelzellen) dienten als Positivkontrolle für die von-Willebrand-Faktor Färbung.

2.2.1.6.1 Immunfluoreszenz mit *Anti- α -Smooth-Muscle-Actin* Antikörper

Die Perizyten wurden auf Deckgläschen in 24-well Zellkulturplatten bis zu 70-100 % Konfluenz kultiviert. Zur Vorbereitung der Immunfärbung wurden die Zellen zweimal mit warmen PBS gewaschen, zur Fixierung in ein Methanolbad versetzt und 10 Minuten bei -20 °C gelagert. Im Anschluss wurde die Methanollösung durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die Permeabilisierung der Zellen und die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgten mittels einer 30-minütigen Inkubation bei 4 °C mit 0,05 % Triton X-100 und 1 % BSA in PBS. Ein weiterer dreimaliger Waschschrift mit PBS folgte. Die Inkubation mit der Antikörperlösung (*Monoclonal Anti- α -Smooth-Muscle-Actin-FITC antibody*, 1:50 Verdünnung) erfolgte über Nacht im Dunkeln bei 4 °C. Als Kontrolle dienten Deckgläser, denen der erste Antikörper nicht zugesetzt wurde. So wurde sichergestellt, dass der Fluoreszenznachweis auf der Reaktion des ersten Antikörpers beruhte. Am nächsten Tag wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Zur Gegenfärbung der Zellkerne wurden die Zellen mit DAPI-Lösung (Konzentration:100 ng/ml) versetzt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Proben-Deckgläschen auf Objektträger mit Mounting Medium aufgebracht und über Nacht bei 4 °C ausgehärtet.

2.2.1.6.2 Immunfluoreszenz mit Anti-von-Willebrand-Faktor Antikörper

Die in 24-well Zellkulturplatten auf sterilen Deckgläschen 70-100 % konfluente Perizyten beziehungsweise Endothelzellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und zur Fixierung

in ein Methanolbad versetzt. Nach zehnminütiger Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen und daraufhin zur Membranperforierung und Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Donkey Serum (10 %) und Triton X (0,1 %)-haltigem PBS inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation des ersten Antikörpers (*Anti-von-Willebrand-Factor antibody produced in rabbit*, 1:200 verdünnt in 5 % Donkey Serum in PBS) über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Kontroll-Deckgläschen wurden nur mit PBS ohne ersten Antikörper beschichtet. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde der sekundäre Antikörper (*Anti-Rabbit Cy3*, 1:300 verdünnt in 5 % Donkey Serum in PBS) abgedunkelt für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten Waschgang und der Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI-Lösung (siehe 2.2.1.6.1), wurden die Deckgläser schließlich mit der Zelleseite nach unten auf den beschrifteten Objektträgern mit vorgelegtem Mounting Medium eingebettet.

Die Analyse der Proben erfolgte mit Hilfe des Mikroskops Leica DM IRE2.

2.2.2 Stimulationsexperimente

2.2.2.1 Stimulationsexperimente unter normoglykämischen Bedingungen

Nach der Isolierung und Charakterisierung der bovinen Retinaperizyten sollte zunächst überprüft werden, ob durch Stimulation mit Angiotensin II, das wie im Vorherigen beschrieben bei Diabetikern in der Retina vermehrt synthetisiert wird, die Expression von Markern induziert werden kann, deren Bedeutung bei der diabetischen Retinopathie bekannt ist. Hierzu wurde der angiogene Wachstumsfaktor VEGF, das pro-entzündliche Zytokin Interleukin-6 sowie die Apoptoseparameter Caspase-3 und Bax bestimmt. Für das Stimulationsexperiment wurden die Zellen unter normoglykämischen Bedingungen in 6-well Zellkulturplatten in 3 ml Medium (5,6 mM Glukosekonzentration) bis zur Konfluenz kultiviert. 24 Stunden vor der Stimulation wurde das Medium auf Hungermedium (5,6 mM Glukosekonzentration) umgestellt. Am folgenden Tag wurde nochmals das alte Medium abgesaugt und frisches Hungermedium (5,6 mM Glukosekonzentration) zugesetzt. Dabei gab man pro Well 2 ml frisches Medium. Daraufhin wurden die Perizyten mit den Substanzen Angiotensin II (Ang II) und dem AT_1 -Rezeptorblocker Candesartan (Cand) (siehe Tab. 2) behandelt, wobei mit Candesartan 30 Minuten vorinkubiert wurde. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen. Kontrolliert wurde ebenfalls für Eigeneffekte des Lösungsmittels für Candesartan, DMSO. In Abbildung 6 ist die Belegung der Wells für das Stimulationsexperiment graphisch dargestellt. Die verwendeten Substanzen wurden zuvor in ihren entsprechenden Lösungsmitteln suspendiert, weiter verdünnt, aliquotiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert (siehe Tab.3). Pro Stimulationszeitpunkt wurden für jeden Ansatz 2

Wells verwendet. Die Zellen wurden 6 Stunden mit den Stimuli bei 37 °C und 5 % CO₂ im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Nach Abschluss der Stimulation erfolgte die Zellernte.



Abb. 6: Belegung der Platten für das Stimulationsexperiment unter normoglykämischen Bedingungen
Angiotensin II (Ang II), Candesartan (Cand), Dimethylsulfoxid (DMSO)

2.2.2.2 Glukosezeitreihen

Die Zellen wurden in 6-well Zellkulturplatten bis zur Konfluenz 1, 2, 3 oder 7 Tage in Medium M2 mit einer Glukosekonzentration von 28 mM kultiviert. Somit konnte der Effekt einer erhöhten Glukosekonzentration in Perizyten untersucht werden. Eine Endkonzentration von 28 mM im Medium M2 erhielt man, indem 800 mg D-Glukose in 10 ml Medium M2 gelöst und schließlich in einer Verdünnung von 1:20 dem Medium M2 zugesetzt wurden. Als Kontrolle wurden Zellen in Medium M2, welches eine physiologische Glukosekonzentration (5,6 mM) hatte, kultiviert. Jeder Ansatz umfasste zwei Wells. Zur Aufrechterhaltung der Glukosekonzentration erfolgte alle zwei Tage ein Mediumwechsel.

2.2.2.3 Stimulationsexperimente unter hyperglykämischen Bedingungen

Basierend auf den Ergebnissen der Glukosezeitreihe (es konnte bei der Mehrheit der untersuchten Marker ein Expressionsmaximum nach 7-tägiger Inkubation in hyperglykämischen Medium beobachtet werden) wurden die Zellen in 6-well Zellkulturplatten 7 Tage lang in je 3 ml Medium mit einer erhöhten Glukosekonzentration (28 mM) bis zur Konfluenz kultiviert. 24 Stunden vor der Stimulation wurde das Medium auf Hungermedium (28 mM Glukosekonzentration) umgestellt. Am folgenden Tag wurde nochmals das alte Medium abgesaugt und frisches Hungermedium (28 mM Glukosekonzentration) zugesetzt. Dabei gab man pro Well 2 ml frisches Medium. Nach 7-tägiger Kultivation in hyperglykämischen Medium für eine weitere 6-stündige Inkubation wurden den Zellen folgende Substanzen zugesetzt: 10⁻⁷ M Angiotensin II (Ang II), 10⁻⁵ M AT₁-Rezeptorantagonist Candesartan (Cand), 10⁻⁶ M AT₂-

Rezeptoragonist Compound 21 (C21) und 10^{-5} M AT_2 -Rezeptorantagonist PD 123319 (PD). Candesartan und PD 123119 wurden 30 Minuten vor Angiotensin II beziehungsweise Compound 21 den Zellen zugegeben. Der alleinige Zusatz des Lösungsmittels für Candesartan, DMSO, diente als Kontrolle zum Ausschluss von DMSO Eigeneffekten. Auch dienten Zellen, die gleichzeitig unter normoglykämischen Bedingungen (5,6 mM Glukosekonzentration) kultiviert wurden, als Kontrolle. Die verwendeten Substanzen wurden zuvor in ihren entsprechenden Lösungsmitteln suspendiert, weiter verdünnt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert (siehe Tab. 2). In Abbildung 7 ist die Belegung der Wells für das Stimulationsexperiment graphisch dargestellt. Pro Stimmulationszeitpunkt wurden für jeden Ansatz 2 Wells verwendet. Nach der Inkubationszeit von 6 Stunden bei 37 °C und 5% CO_2 im Zellkulturbrutschrank erfolgte die Zellernte.

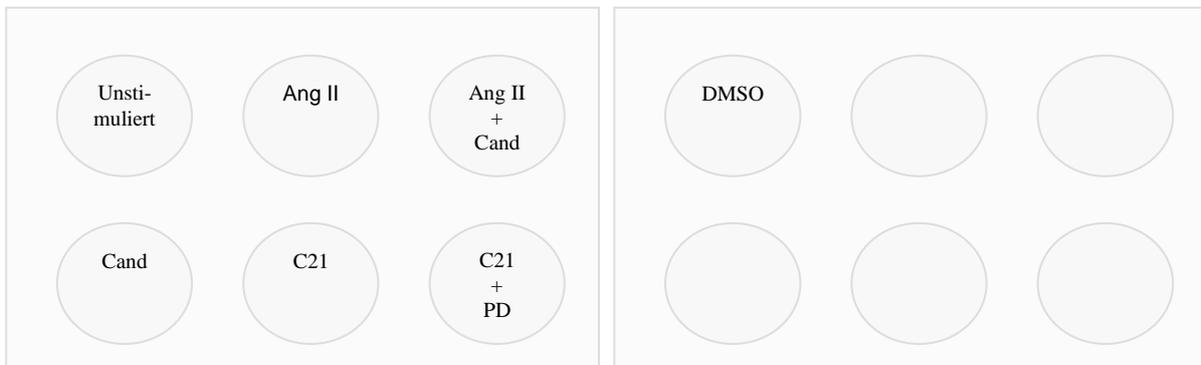


Abb. 7: Belegung der Platten für das Stimulationsexperiment unter hyperglykämischen Bedingungen Angiotensin II (Ang II), Candesartan (Cand), Compound 21 (C21), PD 123319 (PD), Dimethylsulfoxid (DMSO)

Tab. 2: Lösungsmittel, Konzentration der Stocklösung und Konzentration der verwendeten Substanzen

Substanz	Lösungsmittel	Konzentration der Stocklösung	Benötigte Konzentration	Zugabe pro Well
Angiotensin II	Aqua bidest.	10^{-4} M	10^{-7} M	$2\ \mu\text{l}$
Compound 21	Aqua bidest.	10^{-3} M	10^{-6} M	$2\ \mu\text{l}$
PD 123319	Aqua bidest.	10^{-3} M	10^{-5} M	$20\ \mu\text{l}$
Candesartan	DMSO	10^{-3} M	10^{-5} M	$20\ \mu\text{l}$

2.2.2.4 Zellernte

Nach der Inkubationszeit erfolgte die Zellernte. Das Medium wurde abgesaugt, je Well $500\ \mu\text{l}$ PBS hinzugefügt und mit einem Zellschaber die Zellen von der Unterlage gelöst. Die Suspension wurde je Ansatz auf ein Eppendorfgefäß überführt, 10 Minuten bei 4 °C und 10000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 RNA-Isolation

Zur RNA-Isolierung wurde das NucleoSpin®RNA II Kit (Macherey-Nagel, Düren, D) eingesetzt.

Je Probe wurden folgende Substanzen verwendet:

- 350 µl RA1 Puffer
- 3, 5 µl β-Mercaptoethanol
- 350 µl 70 % Ethanol
- 350 µl MDB (Membrane Desalting Buffer)
- DNase-Reaktionsmix: 10 µl rDNase + 90 µl rDNase Reaktionspuffer
- Waschgänge
 - 200 µl RA2 Puffer
 - 600 µl RA3 Puffer
 - 250 µl nochmals RA3 Puffer
- 35 µl Aqua bidest. (RNase-frei)

Um die Zellen zu lysieren, wurden zu jedem Zellpellet 350 µl RA1 Puffer und 3,5 µl β-Mercaptoethanol gegeben. Das aus einer Probe resultierende Lysat wurde mit Hilfe eines NucleoSpin Filters in ein Sammeleppendorfggefäß filtriert und bei 13.000 U/min zentrifugiert. Der Filter wurde verworfen. Dem Filtrat wurden 350 µl 70 % Ethanol hinzugefügt und die Probe durch auf- und abpipettieren vermischt, bis keine Schlieren mehr zu sehen waren. Die Probe wurde im Anschluss auf eine NucleoSpin Säule mit einem 2 ml Eppendorfggefäß überführt und 30 Sekunden bei 13000 U/min zentrifugiert. Der Durchlass wurde verworfen. Daraufhin fügte man der NuceloSpin Säule 350 µl MDB hinzu, ein weiterer Zentrifugierungsschritt (1 min, 13000 U/min) folgte. Als nächstes erfolgte der DNA-Verdau mittels eines DNase-Reaktionsmixes, bestehend aus 10 µl rDNase und 90 µl rDNase-Reaktions-Puffer. 95 µl dieses DNase-Reaktionsmixes wurden mittig auf die Säule aufgetragen und 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Folgenden schlossen sich drei Waschschrte an. Dabei wurde nach jedem Waschgang der Durchlass verworfen. Um die rDNase zu deaktivieren wurden beim ersten Waschschrte 200 µl RA2 in die Säule gegeben und 30 Sekunden bei 13000 U/min zentrifugiert. Beim zweiten Waschgang erfolgte eine Gabe von 600 µl RA3 auf die Säule und wiederum eine Zentrifugation von 30 Sekunden bei 13000 U/min. Der letzte Waschgang bestand aus einem Zusatz von 250 µl von RA3 und einem zweiminütigen Zentrifugieren bei 13000 U/min. Danach wurde die Säule in ein neues Eppendorfggefäß überführt. Schließlich wurde die

RNA mit 35 µl Aqua bidest. (RNase-frei) eluiert. Das Wasser wurde auf die Säule gegeben, eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und eine Minute bei 13000 U/min zentrifugiert.

Die isolierte RNA wurde sofort bei -80 °C bis zur Weiterverwendung gelagert. Die Bestimmung der RNA-Gesamt-Konzentration erfolgte durch Messung mit dem NanoDrop R Spectrometer ND-1000.

2.2.3.2 cDNA Synthese (reverse Transkription)

Vor der quantitativen *Real-time* PCR erfolgte eine Umschreibung der isolierten RNA in komplementäre DNA (cDNA).

Zur Anwendung kamen dafür folgende Substanzen (Promega, Mannheim, D):

- Random Primer
- M-MLV Reverse Transkriptase H Minus
- 5-MLV-Puffer
- RNasin
- dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

Die gefrorene RNA wurde aufgetaut und vermischt. Für die Umschreibung wurden 200 ng RNA für jeden Ansatz verwendet. Die RNA wurde mit Aqua bidest. auf 15,5 µl aufgefüllt und 2 µl Random Primer (zuvor 1:10 verdünnt) je Probe dazugegeben. Als nächstes erfolgte eine 10-minütige Inkubation bei 70 °C. Daraufhin wurden die Proben 1 Minute auf Eis abgekühlt und im Anschluss je 7,5 µl Mastermix zu den Proben hinzugefügt. Als Kontrolle (RT- genannt) wurden zusätzlich ein paar Proben mitgeführt, zu denen je 7 µl Mastermix ohne MLV Reverse Transkriptase hinzugefügt wurde. Nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C wurden die gewonnene cDNA beziehungsweise die RT- bei -20 °C aufbewahrt. Die gewonnene cDNA hatte eine Konzentration von 8 ng/µl.

Der Mastermix enthielt je Probe folgende Substanzen:

- | | |
|-----------------------------|---------|
| ▪ 5-MLV-Puffer | 5 µl |
| ▪ dNTP (je 10mM) | 1,25 µl |
| ▪ MLV Reverse Transkriptase | 0,5 µl |
| ▪ RNasin | 0,75 µl |

2.2.3.3 Quantitative *Real-Time* PCR

Die Quantitative *Real-Time* PCR beruht auf dem Prinzip einer konventionellen PCR. Im Gegensatz zur semiquantitativen PCR ermöglicht sie jedoch die Zunahme der PCR-Produkte

während der PCR in Echtzeit zu verfolgen. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt. Eingesetzte Fluoreszenzfarbstoffe interkalieren mit dem DNA-Doppelstrang. Dabei ist die gemessene Fluoreszenzintensität der Menge an PCR-Produkt direkt proportional. Generell verläuft eine PCR-Reaktion in vier verschiedenen kinetischen Stufen: die lag-Phase, die log-Phase (exponentielle Phase), die Verzögerungsphase und die Plateauphase. Beim Übergang in die exponentielle Phase wird das Fluoreszenzsignal des PCR-Produktes größer als das Hintergrundsignal der Probe. Der PCR-Zyklus, in dem dieses Quantum an Fluoreszenz zu messen ist, wird als Threshold-Zyklus (CT-Wert) bezeichnet. Je größer der CT-Wert, das heißt je höher die Zyklenzahl, bis die Probe diese Schwelle erreicht, desto geringer fällt die cDNA Konzentration in der Probe aus. Mittels anschließender Schmelzkurvenanalysen kann die Identität des PCR-Produktes überprüft und die Bildung von Primerdimeren erkannt werden. Durch eine langsame kontinuierliche Erhöhung der Temperatur werden die beiden Einzelstränge der farbstoffmarkierten doppelsträngigen DNA in Abhängigkeit von der für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur voneinander getrennt. Die daraus folgende Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffes bedingt eine Abnahme der Fluoreszenz. Da die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt hat, als unspezifisch entstehende Primerdimere, ist eine Unterscheidung möglich (Higuchi et al., 1993; Heid et al., 1996).

2.2.3.3.1 Primer

Die Primer für 18S rRNA und IL-6 wurden mit dem Programm Primer3 unter <http://biotools.umassmed.edu> entworfen. Für VEGF, Bax und Caspase-3 wurden die Primersequenzen aus der Literatur entnommen. Mittels Sequenzvergleich mit öffentlich verfügbaren annotierten Sequenzdatenbanken (European Bioinformatics Institute (EBI) Ensembl, www.ensembl.org) wurde überprüft, inwieweit die Primersequenzen eine Exon-Exon-Grenze des Zielgens überspannen. Außerdem wurden die Primer jeweils gegen das gesamte bovine Genom (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) geblastet. Die Primerpaare für Bax sind in (Ushizawa et al., 2006), die von Caspase-3 in (Park et al., 2007) und die von VEGF in der Arbeit von (Yao et al., 2006) beschrieben.

Eine Liste der verwendeten Primer findet sich in Tabelle 3.

Tab. 3: Darstellung der Primersequenzen und Annealingtemperatur der verwendeten Primer

Gen	Sequenz	Annealingtemperatur [°C]
18S rRNA	forward 5'-GGGGAGGTAGTGACGAAAAA-3' reverse 5'-CGCTCCCAAGATCCAACACTAC-3'	60
IL-6	forward 5'-ATGGAGGAAAAGGACGGATG-3' reverse 5'-TTGTGGCTGGAGTGGTTATT-3'	60
VEGF	forward 5'-CCCACGAAGTGGTGAAGTTCA-3' reverse 5'-CCACCAGGGTCTCGATGG-3'	60
Caspase-3	forward 5'-GGACCCGTCAATTTGAAAAA-3' reverse 5'-CATGTCATCCTCAGCACCCAC-3'	55
Bax	forward 5'-CGCCCTTTTCTACTTTGCCA-3' reverse 5'-TCAACTCGGGCACCTTGG-3'	60

2.2.3.3.2 Durchführung

Für die quantitative *Real-time* PCR wurden pro Ansatz 20 µl (bei Verwendung des SYBR Green® Housemix) (siehe Tab. 4) beziehungsweise 15 µl (bei Verwendung des kommerziellen Power SYBR Green® Mastermix) des quantitativen *Real-time* PCR Mastermixes in einer geeigneten 96-well Platte vorgelegt. Daraufhin wurden 10 µl der cDNA (ausgehend von einer 1:10 Verdünnung) hinzugefügt. Es wurden jeweils Triplets der Proben pipettiert. Nach dem Bedecken der Platte mit einer speziellen optischen Folie wurde sie eine Minute bei 4 °C und 1000 rpm zentrifugiert. Die Reaktionen wurden in der PCR-Maschine Mx 3000P™ durchgeführt, die Messung erfolgte mittels der dazugehörigen Mx Pro QPCR Software. In Abhängigkeit vom gewählten Primer und des genutzten quantitativen *Real-time* PCR Mastermixes (siehe Tab. 5 und Tab. 6) wurden für die quantitative *Real-time* PCR verschiedene Temperaturprofile (siehe Tab. 7 und Tab. 8) verwendet. Den Amplifikationszyklen ging eine Aktivierung der Taq-Polymerase bei 95 °C voraus. Es schlossen sich 40 Amplifikations-Zyklen an bestehend aus der Denaturierungsphase, der Annealing Phase, in der sich die Primer spezifisch an bestimmte Areale der nun einsträngigen DNA anlagerten und der Elongationsphase. Zur Generierung der Schmelzkurve folgte ausgehend von 55 °C die schrittweise Erhöhung der Temperatur bis zu einer maximalen Temperatur von 95 °C.

Tab. 4: Zusammensetzung des SYBR Green® Housemix als 10 ml Vorratslösung

	Konzentration	Endkonzentration in der Reaktion	Volumen [ml]
H ₂ O, ultra pure	/	/	8,91
KCl, 2,5 M	100 mM	50 mM	0,4
Tris-HCl, 1 M	20 mM	10 mM	0,2
Mg ²⁺ -Solution, 1 M	13 mM	6,5 mM	0,13
dATP, 100 mM	0,4 mM	0,2 mM	0,04
dCTP, 100 mM	0,4 mM	0,2 mM	0,04
dTTP, 100 mM	0,4 mM	0,2 mM	0,04
dGTP, 100 mM	0,4 mM	0,2 mM	0,04
SYBR Green®	0,02 %	0,01 %	0,001
DMSO	4 %	2 %	0,001
Tween 20	0,01 %	0,005 %	0,001
ROX-Solution	2 %	1 %	0,2
NP 40	0,01 %	0,005 %	0,001

Tab. 5: Komponenten des quantitativen *Real-time* PCR Mastermix mit dem SYBR Green® Housemix

Bestandteil	pro Probe [µl]	Konzentration
SYBR Green® Housemix	15	/
Primer forward	0,6	10 µM
Primer reverse	0,6	10 µM
Taq-Polymerase	0,075	5 U/µl
ddH ₂ O	1,3	/

Tab. 6: Komponenten des quantitativen *Real-time* PCR Mastermix mit dem kommerziellen Power SYBR Green® Mastermix

Bestandteil	pro Probe [µl]	Konzentration
SYBR Green® Mastermix	12,5	/
Primer forward	0,6	10 µM
Primer reverse	0,6	10 µM
ddH ₂ O	1,3	/

Tab. 7: Temperaturprofil einer quantitativen *Real-time* PCR mit SYBR Green® Housemix

Schritt	Zeit	Temperatur
Aktivierung	2 min	95 °C
Denaturierung*	15 s	95 °C
Annealing*	30 s	Primerabhängig (Tab. 3)
Elongation*	15 s	72 °C
Dissotiationskurve	30 s	55 °C
	30 s	95 °C

* 40 Zyklen

Tab. 8: Temperaturprofil einer quantitativen *Real-time* PCR mit dem kommerziellen Power SYBR® Green Mastermix

Schritt	Zeit	Temperatur
Aktivierung	10 min	95 °C
Denaturierung*	15 s	95 °C
Annealing*	60 s	Primerabhängig (Tab. 3)
Elongation*	15 s	72 °C
Dissotiationskurve	30 s	55 °C
	30 s	95 °C

* 40 Zyklen

2.2.3.3 Auswertung

In jedem quantitativen *Real-time* PCR Experiment wurden mehrere Negativkontrollen mitgeführt. So wurden statt der Probe 10 µl Aqua bidest. und 10µl der hergestellten RT-eingesetzt.

Dabei sollten die CT-Werte dieser Kontrollen mindestens um 6 größer sein als die der Proben.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur relativen Quantifizierung die Methode nach Livak und Schmittgen herangezogen (Livak und Schmittgen, 2001).

Zur Normalisierung der Daten wurde die Expressionsrate des Referenzgenes 18S rRNA, ein Gen, dessen Expression nur wenig von äußeren Bedingungen abhängt und auch als *housekeeping gene* bezeichnet wird, in die Auswertung einbezogen. Als erster Schritt wurde für jede untersuchte Probe der CT-Wert des Referenzgens vom CT-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert ($\Delta\text{CT} = \text{CT Zielgen} - \text{CT Referenzgen}$). Daraufhin wurde vom ΔCT -Wert der experimentell behandelten Proben der ΔCT -Wert einer Kontrolle abgezogen ($\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT Behandlung} - \Delta\text{CT Kontrolle}$). Der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle, normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine

Standardprobe, ergab sich aus der Formel $2^{-\Delta\Delta CT}$. Da die Ermittlung der CT-Werte in einer Dreifachbestimmung erfolgte, wurde aus den bereits berechneten $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werten das arithmetische Mittel bestimmt und das Expressionsniveau schließlich relativ zur Kontrollprobe, die als Standard mit 100 % gesetzt wurde, angegeben.

Die bei der quantitativen Real-Time PCR erhobenen CT-Werte wurden mittels one-way-Anova und anschließendem Bonferroni post-hoc Test miteinander verglichen. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der Statistiksoftware GraphPAD Prism ermittelt.

Es wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ angenommen, $p < 0,001$ wurde als hochsignifikant angesehen. Dargestellt ist ein repräsentativer von 2-3 Versuchen.

3 Ergebnisse

3.1 Primäre, retinale Perizyten vom Rind als Zellkulturmodell

Aus den Retinagefäßen von Rinderaugen wurden wie unter 2.2.1.1 beschrieben Perizyten isoliert und charakterisiert (vgl. 2.2.1.6). Die Charakterisierung dieser Zellen war besonders wichtig, um sie sicher als Perizyten zu identifizieren und so klar gegenüber Endothelzellen abzugrenzen.

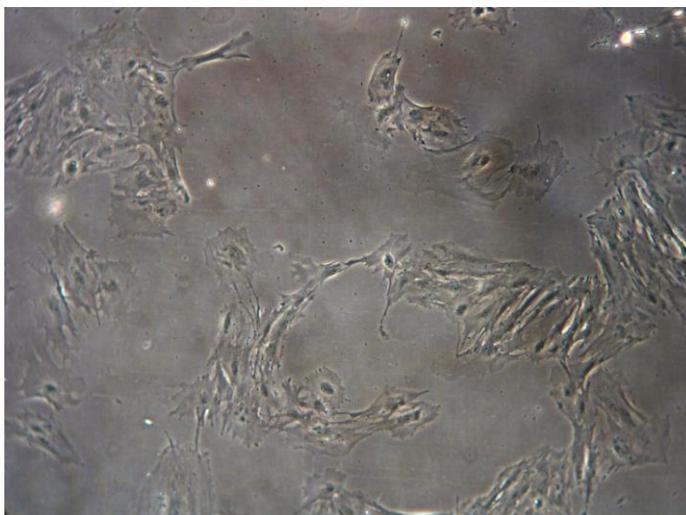


Abb. 8: Typische Morphologie der Perizytenzellkultur

Wie für Perizyten typisch bildeten die isolierten Zellen große, flache, irregulär begrenzte Zellkörper mit dünnen, langen Zytoplasmafortsätzen aus (siehe Abb. 8). Ein pflastersteinartiges Muster, wie es für Endothelzellen charakteristisch wäre, fand sich nicht. Hinsichtlich der Morphologie und des Wachstumsverhaltens ergaben sich keine Unterschiede zwischen der frischen und der eingefrorenen Zellkultur.

Als weitere Methode zur Charakterisierung der isolierten Zellen diente die indirekte Immunfluoreszenz. Die Identifizierung der Zellen erfolgte über den Nachweis von α -Aktin und über die fehlende Anfärbbarkeit mit Anti-von-Willebrand-Faktor Antikörpern. Auch hier zeigten sich keine Unterschiede zwischen den frischen und kryokonservierten Zellen. Bei den Perizyten zeigte sich das α -Smooth-Muscle-Actin (α -SMA) als fibrilläre Stränge. Gleichzeitig erfolgte die Visualisierung der Zellkerne durch die blaue Fluoreszenz der DAPI-Färbung (siehe Abb. 9).

Als Positivkontrolle für die von-Willebrand-Faktor Färbung dienten Endothelzellen (HUVEC, Humane Umbilikale Venenendothelzellen), bei denen sich im Gegensatz zu den Perizyten ein typisches punktförmiges zytoplasmatisches Muster (rote Fluoreszenz) erkennen ließ (siehe Abb. 10 und Abb. 11).

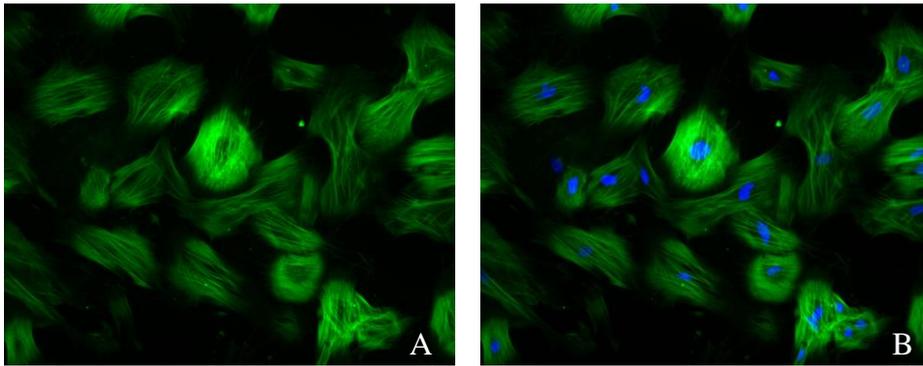


Abb. 9: Darstellung von α -Smooth-Muscle-Actin in Perizyten

Aktinbündel wurden durch spezifischen, FITC-markierten Antikörper gegen α -Aktin (grüne Fluoreszenz) sichtbar gemacht (A) Gleichzeitig erfolgte zur Visualisierung der Zellkerne die DAPI Färbung (blaue Fluoreszenz) (B)

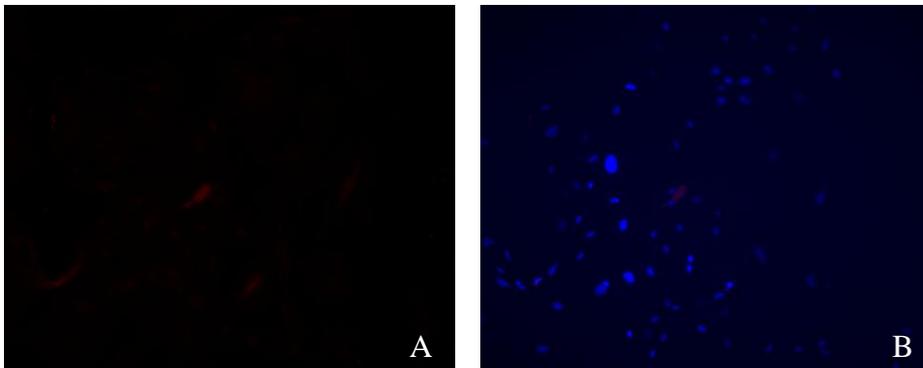


Abb. 10: Fehlende Anfärbarkeit der Perizyten mit Anti-Von-Willebrand-Faktor Antikörpern in der indirekten Immunfluoreszenz

Perizyten wurden mit Anti-von-Willebrand-Faktor Antikörpern (rote Fluoreszenz) markiert (A) und gleichzeitig mit DAPI als Kontrolle (blaue Fluoreszenz) dargestellt (B)

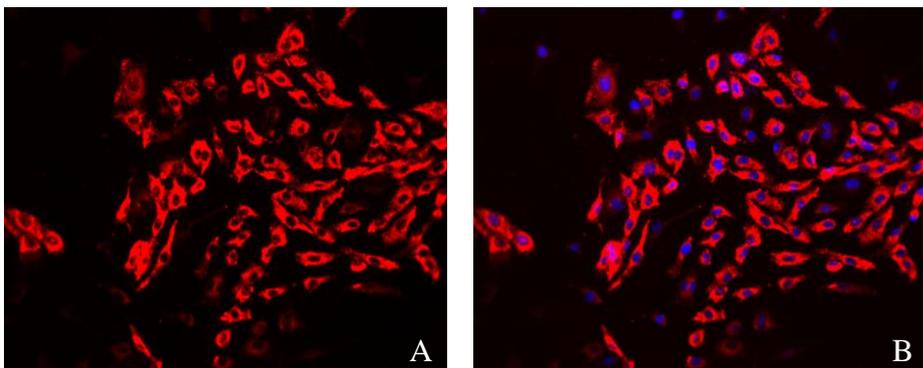


Abb. 11: Darstellung vom Von-Willebrand-Faktor in Endothelzellen

Konfluente Endothelzellen (HUVEC, Humane Umbilikale Venenendothelzellen) wurden mit Anti-von-Willebrand-Faktor Antikörpern (rote Fluoreszenz) markiert (A) und gleichzeitig mit DAPI als Kontrolle (blaue Fluoreszenz) dargestellt (B)

3.2 Stimulationsexperimente

3.2.1 Einfluss von Angiotensin II auf die Expression von Angiogenese-, Inflammations- und Apoptoseparametern in primären, bovinen, retinalen Perizyten

Nach der Isolierung und Charakterisierung der bovinen Retinaperizyten wurde überprüft, ob durch Stimulation mit Angiotensin II die Expression von für die diabetische Retinopathie bedeutenden Markern induziert werden kann. Dabei wurde der angiogene Wachstumsfaktor VEGF, das pro-entzündliche Zytokin Interleukin-6 sowie die Apoptosemarker Caspase-3 und Bax untersucht. Für das Stimulationsexperiment wurden die Zellen unter normoglykämischen Bedingungen (5,6 mM Glukose) bis zur Konfluenz kultiviert und daraufhin für 6 h mit Angiotensin II behandelt. Um zu überprüfen, ob die durch Angiotensin II hervorgerufenen Effekte über den AT₁-Rezeptor vermittelt werden, erfolgte die Blockierung des AT₁-Rezeptors durch eine 30-minütige Vorinkubation mit Candesartan. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen, als *housekeeping* Gen 18S rRNA. Mögliche Eigeneffekte des Lösungsmittels (DMSO) für Candesartan wurden ebenfalls kontrolliert. Im weiteren Verlauf wurde aus den Zellen RNA isoliert und mittels quantitativer *Real-Time* PCR die Expression von VEGF, IL-6, Caspase-3 und Bax analysiert.

3.2.1.1 Genexpression von VEGF nach Behandlung mit Angiotensin II

Es konnte gezeigt werden, dass nach 6 h Inkubation mit Angiotensin II die VEGF Expression um etwa 290 % gesteigert wurde. Die gleichzeitige Gabe von Candesartan reduzierte diese Mehrproduktion bis fast auf den Ausgangswert zurück. Die Expression von VEGF wurde durch die alleinige Behandlung mit Candesartan oder DMSO dagegen nicht beeinflusst (siehe Abb.12).

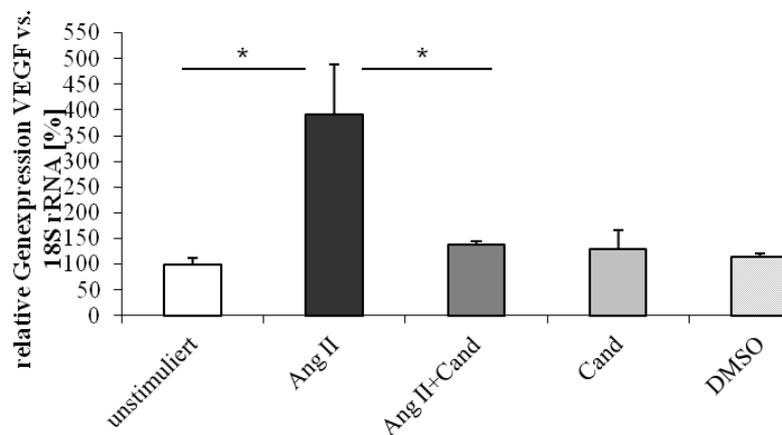


Abb. 12: Einfluss von Angiotensin II auf die Expression von VEGF in Perizyten

Perizyten wurden in Medium mit 5,6 mM Glukose bis zur Konfluenz kultiviert. Daraufhin erfolgte die 6-stündige Stimulation mit 10^{-7} M Angiotensin II (Ang II), 10^{-5} M Candesartan (Cand) und DMSO. Die Ergebnisse sind in Relation zur Kontrolle (unstimulierte Zellen) dargestellt (Kontrolle = 100%) (* $p < 0,05$).

3.2.1.2 Genexpression von IL-6 nach Behandlung mit Angiotensin II

Die Stimulation mit Angiotensin II führte zu einem signifikanten Anstieg der IL-6 Expression. Die simultane Behandlung der Zellen mit dem AT_1 -Rezeptorblocker Candesartan führte zu keiner Expressionsänderung der Mehrproduktion. Auch hier hatte die alleinige Behandlung mit Candesartan oder DMSO keinen signifikanten Effekt auf die IL-6 Expression (siehe Abb. 13).

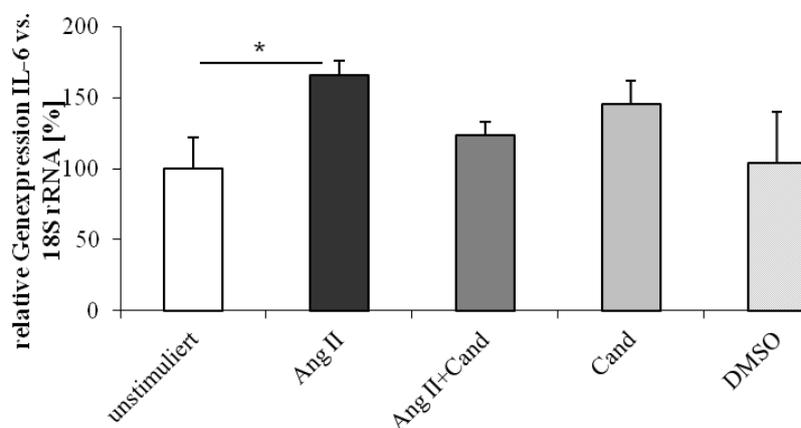


Abb. 13: Einfluss von Angiotensin II auf die Expression von IL-6 in Perizyten

Perizyten wurden in Medium mit 5,6 mM Glukose bis zur Konfluenz kultiviert. Daraufhin erfolgte die 6-stündige Stimulation mit 10^{-7} M Angiotensin II (Ang II), 10^{-5} M Candesartan (Cand) und DMSO. Die Ergebnisse sind in Relation zur Kontrolle (unstimulierte Zellen) dargestellt (Kontrolle = 100%) (* $p < 0,05$).

3.2.1.3 Genexpression von Caspase-3 und Bax nach Behandlung mit Angiotensin II

Prozentual erhöhte sich die Expression des Apoptoseparameters Caspase-3 nach 6-stündiger Inkubation mit Angiotensin II um etwa 96 %. Die Vorinkubation mit Candesartan konnte diese Angiotensin II-abhängige Induktion inhibieren. Sowohl DMSO als auch Candesartan beeinflussten die basale Caspase-3 Expression nicht (siehe Abb. 14).

Die Inkubation der Perizyten mit Angiotensin II hatte keinen Effekt auf die Bax-Expression. Allerdings führte die Behandlung der Zellen mit Angiotensin II und Candesartan zu einer Reduktion der Bax-kodierenden mRNA unter basale Levels. Candesartan alleine und DMSO hatten keine signifikanten Effekte (siehe Abb. 15).

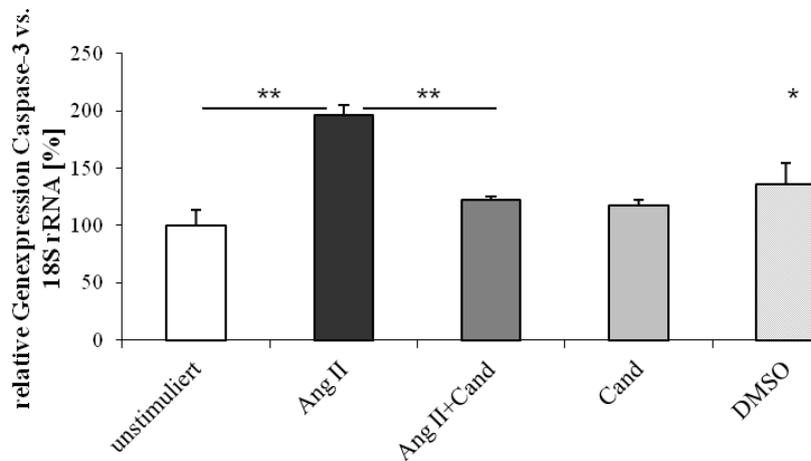


Abb. 14: Einfluss von Angiotensin II auf die Expression von Caspase-3 in Perizyten

Perizyten wurden in Medium mit 5,6 mM Glukose bis zur Konfluenz kultiviert. Daraufhin erfolgte die 6-stündige Stimulation mit 10^{-7} M Angiotensin II (Ang II), 10^{-5} M Candesartan (Cand) und DMSO. Die Ergebnisse sind in Relation zur Kontrolle (unstimulierte Zellen) dargestellt (Kontrolle = 100%) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$).

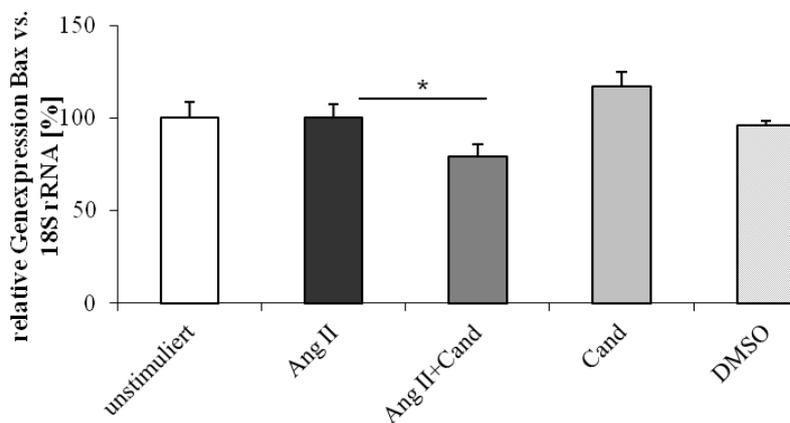


Abb. 15: Einfluss von Angiotensin II auf die Expression von Bax in Perizyten

Perizyten wurden in Medium mit 5,6 mM Glukose bis zur Konfluenz kultiviert. Daraufhin erfolgte die 6-stündige Stimulation mit 10^{-7} M Angiotensin II (Ang II), 10^{-5} M Candesartan (Cand) und DMSO. Die Ergebnisse sind in Relation zur Kontrolle (unstimulierte Zellen) dargestellt (Kontrolle = 100%) (* $p < 0,05$).

3.2.2 Einfluss einer Kultivation unter hyperglykämischen Bedingungen auf die Expression von Angiogenese-, Inflammations- und Apoptoseparametern in primären, bovinen, retinalen Perizyten

Um den Effekt einer erhöhten Glukose-Konzentration im Medium – ähnlich der diabetischen Stoffwechsellage – in Perizyten zu untersuchen, wurden die Zellen in Medium mit einer Glukosekonzentration von 28 mM kultiviert. Auf eine zusätzliche Inkubation der Zellen mit Mannitol zur Imitation des osmotischen Effekts des Glukoseansatzes wurde verzichtet, da bereits mehrfach gezeigt wurde, dass mögliche Expressionsveränderungen direkte Folge der erhöhten Glukosekonzentration und nicht eines osmotischen Effektes sind (Nehmé et al., 2008; Gillies et al., 1993; Li et al., 1998).

Die Perizyten wurden 1, 2, 3 oder 7 Tage in Medium mit 28 mM Glukosekonzentration kultiviert. Daraufhin wurden mittels quantitativer *Real-Time* PCR die Genexpressionsraten von VEGF, IL-6, Caspase-3 und Bax bestimmt. Als Bezugspunkte dienten die Werte der unter normoglykämischen Bedingungen kultivierten Negativkontrolle, sowie die Expressionswerte des *housekeeping*-Gens 18S rRNA.

3.2.2.1 Genexpression von VEGF in primären, bovinen, retinalen Perizyten bei Kultivation unter hyperglykämischen Bedingungen

Die Kultivierung der Perizyten im Medium mit erhöhter Glukosekonzentration ging mit einer signifikanten Erhöhung der Expression von VEGF im Vergleich zu unter normoglykämischen Bedingungen kultivierten Zellen einher. Dabei führte die erhöhte Glukosekonzentration zu einem kontinuierlichen Expressionsanstieg innerhalb des Zeitverlaufs. Die 7-tägige Behandlung mit dem hyperglykämischen Medium erbrachte ungefähr eine Verdopplung der Expression von VEGF (siehe Abb. 16).

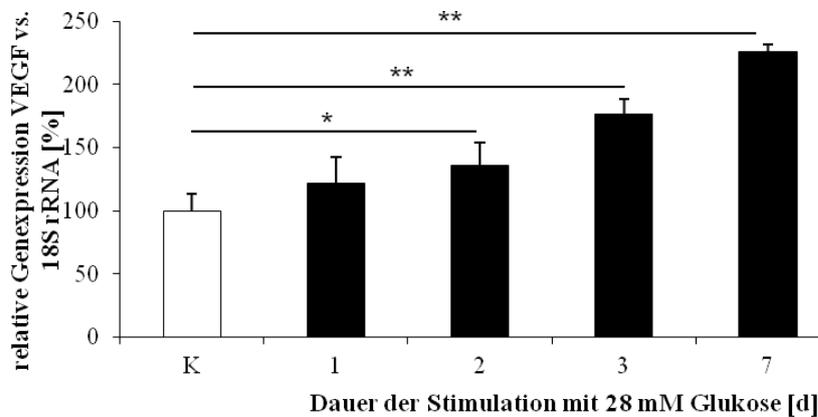


Abb. 16: Glukosezeitreihe – VEGF mRNA Expression

Perizyten wurden in Medium mit 28 mM Glukose über verschiedene Zeiträume kultiviert. Die Ergebnisse sind in Relation zur Kontrolle (K= Zellen in Medium mit 5,6 mM Glukose) dargestellt (Kontrolle = 100%) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$).

3.2.2.2 Genexpression von IL-6 in primären, bovinen, retinalen Perizyten bei Kultivation unter hyperglykämischen Bedingungen

Nach Inkubation der Perizyten mit 28 mM Glukose zeigte sich ein zweigipfliger Anstieg der Expression von IL-6 im Vergleich zur Kontrolle. Bereits nach eintägiger Behandlung konnte eine ca. doppelt erhöhte Expression festgestellt werden. Nach zwei Tagen kam es jedoch zu einer Reduktion der IL-6 Expression fast auf den Ausgangswert zurück. Diese stieg nach 3 Tagen erneut kontinuierlich an, bis sich die IL-6 Expression schließlich nach 7-tägiger erhöhter Glukosegabe wieder ca. verdoppelt hatte (siehe Abb. 17).

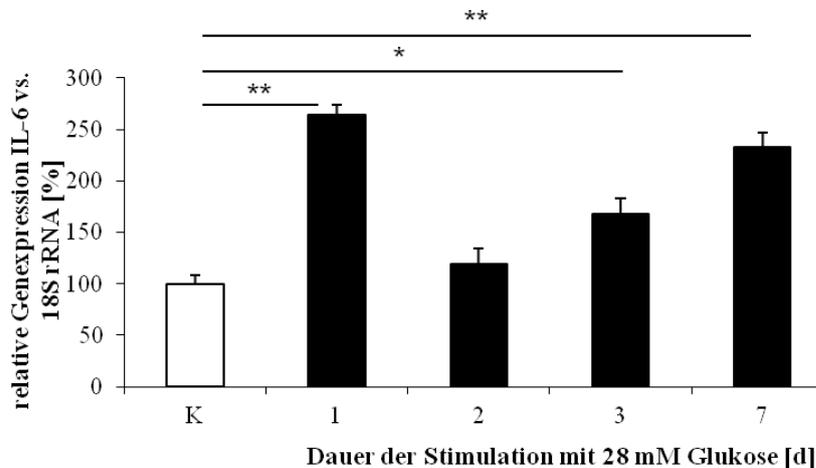


Abb. 17: Glukosezeitreihe – IL-6 mRNA Expression

Perizyten wurden in Medium mit 28 mM Glukose über verschiedene Zeiträume kultiviert. Die Ergebnisse sind in Relation zur Kontrolle (K= Zellen in Medium mit 5,6 mM Glukose) dargestellt (Kontrolle = 100%)

(* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$).

3.2.2.3 Genexpression von Caspase-3 und Bax in primären, bovinen, retinalen Perizyten bei Kultivation unter hyperglykämischen Bedingungen

Auch die Expression von Caspase-3 stieg kontinuierlich in den Perizyten, die hyperglykämischen Bedingungen ausgesetzt wurden, an. Im Vergleich zur Kontrolle, die 100 % gesetzt wurde, kam es nach 7-tägiger Inkubation zu einer Erhöhung um ca. 120 % (siehe Abb. 18).

Es konnte beobachtet werden, dass eine zweitägige Glukosebehandlung einen signifikanten Anstieg der Bax-Expression bewirkte. Nach dreitägiger Glukosebehandlung fiel die Bax-Expression wieder ab (siehe Abb. 19).

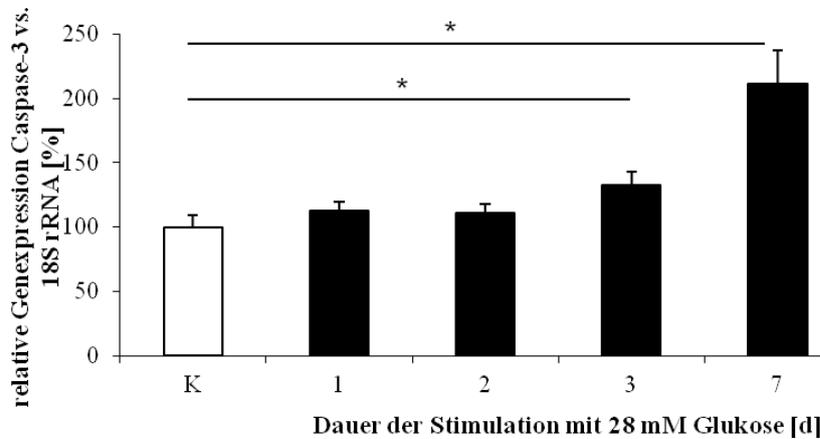


Abb. 18: Glukosezeitreihe – Caspase-3 mRNA Expression

Perizyten wurden in Medium mit 28 mM Glukose über verschiedene Zeiträume kultiviert. Die Ergebnisse sind in Relation zur Kontrolle (K= Zellen in Medium mit 5,6 mM Glukose) dargestellt (Kontrolle = 100%) (* $p < 0,05$).

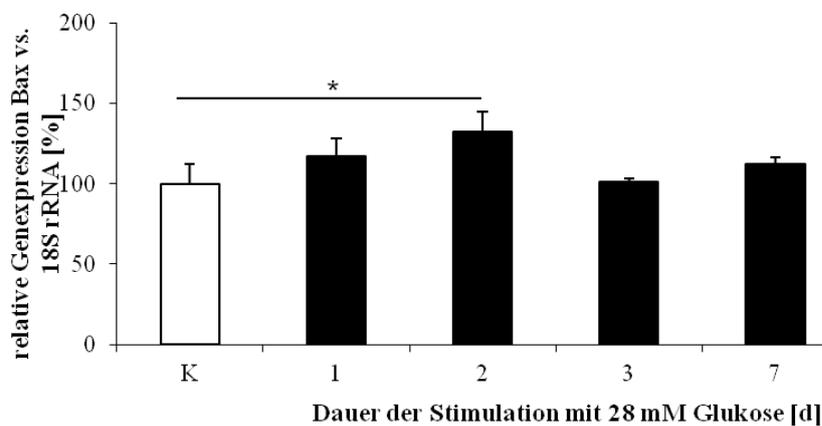


Abb. 19: Glukosezeitreihe – Bax mRNA Expression

Perizyten wurden in Medium mit 28 mM Glukose über verschiedene Zeiträume kultiviert. Die Ergebnisse sind in Relation zur Kontrolle (K= Zellen in Medium mit 5,6 mM Glukose) dargestellt (Kontrolle = 100%) (* $p < 0,05$).

3.2.3 Effekte einer pharmakologischen Interferenz mit dem Renin-Angiotensin-System im *in vitro* Modell der diabetischen Retinopathie

Auf Grundlage der Ergebnisse der Glukosezeitreihe (siehe oben), die für die Mehrheit der untersuchten Marker ein Expressionsmaximum nach 7-tägiger Inkubation in hyperglykämischem Medium zeigte, wurden die Zellen 7 Tage lang in einer erhöhten Glukosekonzentration kultiviert. Um die Auswirkungen eines pharmakologischen Eingriffs in das Renin-Angiotensin-System auf die Genexpression von Angiogenese-, Inflammations- und Apoptoseparametern zu überprüfen, erfolgte anschließend eine jeweils 6-stündige Inkubation mit verschiedenen Substanzen, nämlich mit dem Angiotensin AT₁-Rezeptorblocker Candesartan (10⁻⁵M) oder mit dem Angiotensin AT₂-Rezeptoragonisten Compound 21 (10⁻⁶M). Auch hier dienten Zellen, die unter normoglykämischen Bedingungen kultiviert worden waren, als Kontrolle. Aus den Zellen wurde mRNA isoliert und mittels quantitativer *Real-Time* PCR die Expression von VEGF, IL-6, Caspase-3 und Bax analysiert. 18S rRNA diente als *housekeeping gene*.

3.2.3.1 Einfluss des AT₁-Rezeptorantagonisten Candesartan auf die Expression von Angiogenese-, Apoptose- und Inflammationsparametern in primären, bovinen, retinalen Perizyten bei Kultivation unter hyperglykämischen Bedingungen

Um zu untersuchen, ob eine pharmakologische Blockade des Angiotensin AT₁-Rezeptors in der Lage ist, die durch die hyperglykämischen Kulturbedingungen erhöhten Genexpressionlevels verschiedener Marker für Angiogenese, Apoptose beziehungsweise Inflammation in primären, bovinen, retinalen Perizyten zu reduzieren, wurden die Zellen nach 7-tägiger 28 mM Glukoseinkubation für 6 h mit Angiotensin II und/oder dem AT₁-Rezeptorantagonisten Candesartan behandelt. Dabei wurde Candesartan 30 Minuten vor Angiotensin II den Zellen zugegeben. Zellen, die mit 5,6 mM Glukose kultiviert worden waren, dienten als Kontrolle. Als *housekeeping-Gen* wurde 18S rRNA verwendet. Der alleinige Zusatz des Lösungsmittels für Candesartan, DMSO, diente als Kontrolle zum Ausschluss von DMSO Eigeneffekten.

3.2.3.1.1 Einfluss von Candesartan auf die Genexpression von VEGF in primären, bovinen, retinalen Perizyten bei Kultivation unter hyperglykämischen Bedingungen

Die Expression von VEGF stieg nach 7-tägiger Kultivation unter erhöhter Glukosekonzentration signifikant um etwa 32 % an. Candesartan reduzierte die Glukose-induzierte Mehrexpression von VEGF signifikant auf Werte vergleichbar mit der VEGF Expression in Perizyten unter normoglykämischen Bedingungen. Die Angiotensin II Gabe führte zu keiner weiteren statistisch signifikanten Erhöhung der Glukose-induzierten VEGF Expression. DMSO bewirkte keine Expressionsveränderung (siehe Abb. 20).

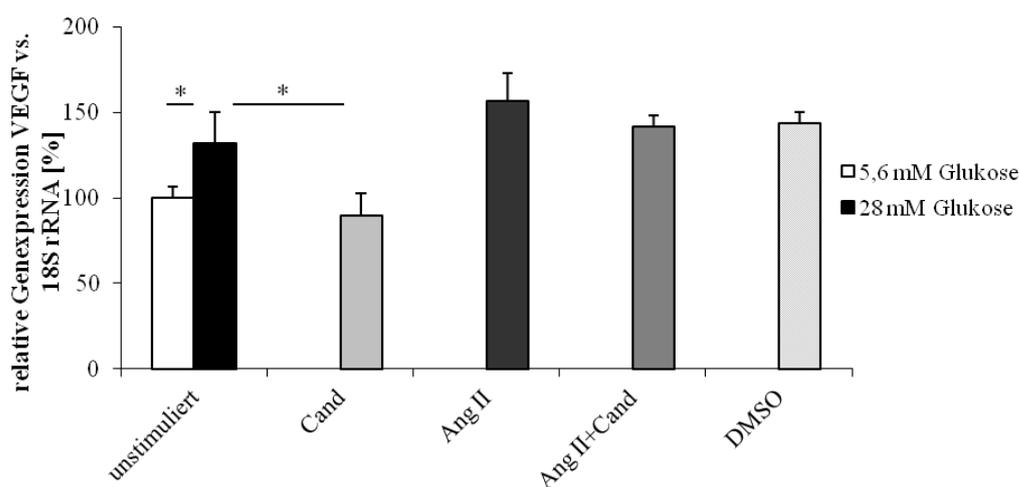


Abb. 20: Einfluss von Candesartan auf die Expression von VEGF in Perizyten unter hyperglykämischen Bedingungen

Perizyten wurden 7 Tage in 28 mM Glukose kultiviert. Daraufhin erfolgte die 6-stündige Stimulation mit 10^{-7} M Angiotensin II (Ang II), 10^{-5} M Candesartan (Cand) und/oder DMSO. Die Ergebnisse sind in Relation zur Kontrolle (unstimulierte Zellen in 5,6 mM Glukose) dargestellt (Kontrolle = 100%) (* $p < 0,05$).

3.2.3.1.2 Einfluss von Candesartan auf die Genexpression von IL-6 in primären, bovinen, retinalen Perizyten bei Kultivation unter hyperglykämischen Bedingungen

Wie in Abbildung 21 dargestellt erhöhte sich die IL-6 Expression nach Kultivation in 28 mM Glukose-haltigem Medium über einen Zeitraum von 7 Tagen um mehr als 200 % gegenüber der normoglykämischen Kontrolle. Diese Mehrexpression konnte durch die Ko-Inkubation mit Candesartan signifikant verringert werden. Die Behandlung mit Angiotensin II führte wiederum nicht zu einem weiteren Anstieg des Inflammationsparameters. Auch hier zeigte DMSO keine signifikanten Änderungen im Expressionsverhalten (siehe Abb. 21).

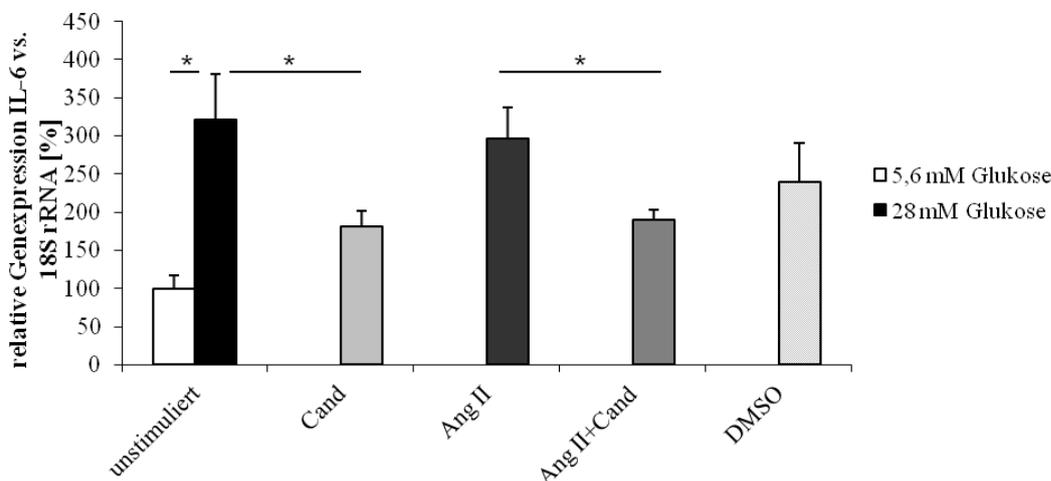


Abb. 21: Einfluss von Candesartan auf die Expression von IL-6 in Perizyten unter hyperglykämischen Bedingungen

Perizyten wurden 7 Tage in 28 mM Glukose kultiviert. Daraufhin erfolgte die 6-stündige Stimulation mit 10^{-7} M Angiotensin II (Ang II), 10^{-5} M Candesartan (Cand) und/oder DMSO. Die Ergebnisse sind in Relation zur Kontrolle (unstimulierte Zellen in 5,6 mM Glukose) dargestellt (Kontrolle = 100%) (* $p < 0,05$).

3.2.3.1.2 Einfluss von Candesartan auf die Genexpression von Caspase-3 und Bax in primären, bovinen, retinalen Perizyten bei Kultivation unter hyperglykämischen Bedingungen

Die Inkubation unter erhöhter Glukosekonzentration führte zu einer vermehrten Expression von Caspase-3. Die alleinige Behandlung mit Candesartan erbrachte keine Expressionsänderung von Caspase-3 gegenüber der mit 28 mM Glukose behandelten Kontrolle. Der Zusatz von Angiotensin II erhöhte additiv und signifikant die Caspase-3 Expression, welche durch die

Zugabe von Candesartan signifikant wieder verringert werden konnte. Das Lösungsmittel DMSO dagegen führte zu keinen signifikanten Abweichungen (siehe Abb. 22).

Die Bax Expression zeigte keinen signifikanten Anstieg nach 7-tägiger Glukosebehandlung. Nach der Stimulation mit Candesartan konnte eine signifikante Reduktion der Bax Expression gegenüber der mit 28 mM Glukose behandelten Kontrolle verzeichnet werden. Die Inkubation mit Angiotensin II führte zu einer Senkung der Glukose-bedingten Bax mRNA Mehrexpression. Dabei zeigte sich jedoch eine hohe Standardabweichung. Das Lösungsmittel DMSO rief wiederum keine signifikanten Abweichungen der Bax Expression hervor (siehe Abb. 23).

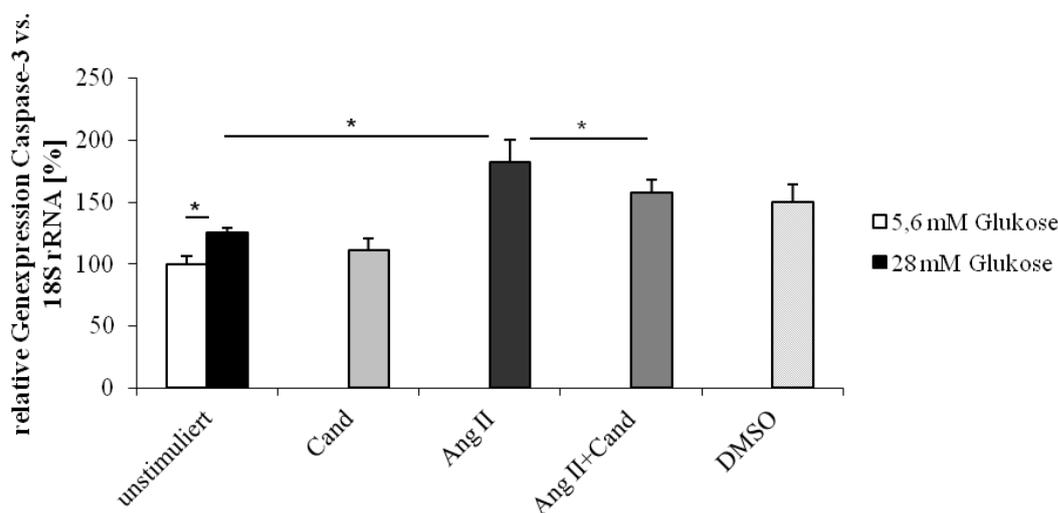


Abb. 22: Einfluss von Candesartan auf die Expression von Caspase-3 in Perizyten unter hyperglykämischen Bedingungen

Perizyten wurden 7 Tage in 28 mM Glukose kultiviert. Daraufhin erfolgte die 6-stündige Stimulation mit 10^{-7} M Angiotensin II (Ang II), 10^{-5} M Candesartan (Cand) und/oder DMSO. Die Ergebnisse sind in Relation zur Kontrolle (unstimulierte Zellen in 5,6 mM Glukose) dargestellt (Kontrolle = 100%) (* $p < 0,05$).

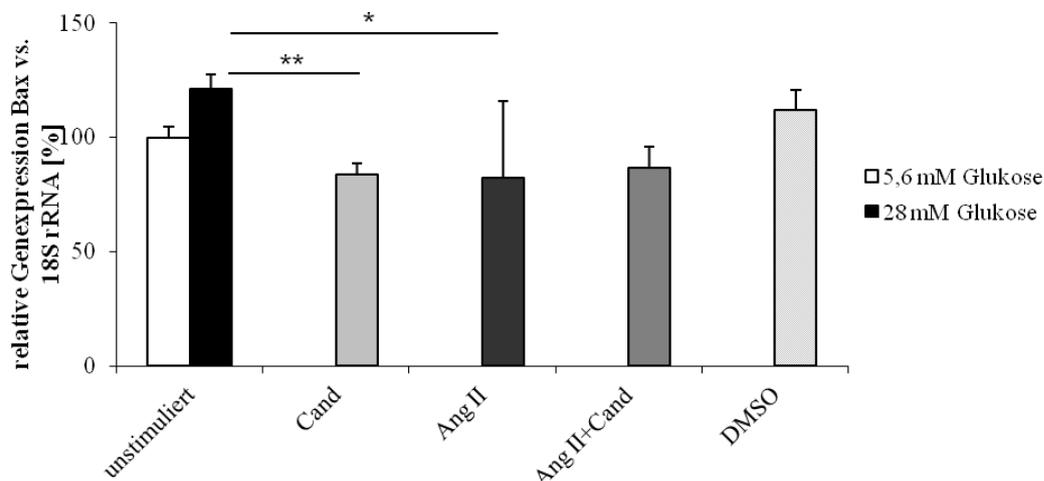


Abb. 23: Einfluss von Candesartan auf die Expression von Bax in Perizyten unter hyperglykämischen Bedingungen

Perizyten wurden 7 Tage in 28 mM Glukose kultiviert. Daraufhin erfolgte die 6-stündige Stimulation mit 10^{-7} M Angiotensin II (Ang II), 10^{-5} M Candesartan (Cand) und/oder DMSO. Die Ergebnisse sind in Relation zur Kontrolle (unstimulierte Zellen in 5,6 mM Glukose) dargestellt (Kontrolle = 100%) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$).

3.2.3.2 Einfluss des AT_2 -Rezeptoragonisten Compound 21 auf die Expression von Angiogenese-, Apoptose- und Inflammationsparametern in primären, bovinen, retinalen Perizyten bei Kultivation unter hyperglykämischen Bedingungen

Nach 7-tägiger Vorbehandlung in 28 mM Glukose wurden die Perizyten für 6 h mit dem AT_2 -Rezeptoragonisten Compound 21 inkubiert. Um zu überprüfen, ob der genexpressionsverändernde Effekt von Compound 21 tatsächlich auf die Stimulation des AT_2 -Rezeptors und nicht auf einen unspezifischen Effekt an einem anderen Rezeptor zurückzuführen ist, wurde ein Teil der Zellen zusätzlich mit dem AT_2 -Rezeptor Antagonisten PD 123319 für 30 Minuten vor Zugabe von Compound 21 vorinkubiert.

3.2.3.2.1 Einfluss von Compound 21 auf die Genexpression von VEGF in primären, bovinen, retinalen Perizyten bei Kultivation unter hyperglykämischen Bedingungen

Die 7-tägige Vorbehandlung mit 28 mM Glukose führte zu einem signifikanten Anstieg der VEGF mRNA Expression gegenüber den Zellen, die in 5,6 mM Glukose kultiviert wurden.

Diese Überexpression wurde durch die Stimulation mit Compound 21 vollständig zurückgeführt. Durch die Vorinkubation mit PD 121339 konnte der Compound 21-Effekt nicht nur komplett aufgehoben werden, sondern die VEGF Expression stieg um ca. 64 % über das Expressionslevel von Perizyten in normoglykämischen Bedingungen an (siehe Abb. 24).

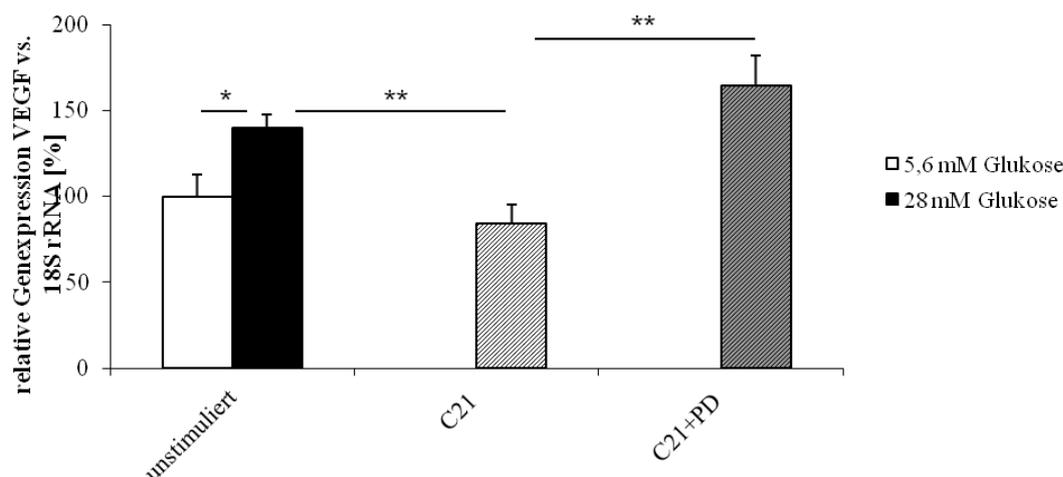


Abb. 24: Einfluss von Compound 21 auf die Expression von VEGF in Perizyten unter hyperglykämischen Bedingungen

Perizyten wurden 7 Tage in 28 mM Glukose kultiviert. Daraufhin erfolgte die 6-stündige Stimulation mit 10^{-6} M Compound 21 (C21) und 10^{-5} M PD 121339 (PD). Die Ergebnisse sind in Relation zur Kontrolle (unstimulierte Zellen in 5,6 mM Glukose) dargestellt (Kontrolle = 100%) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$).

3.2.3.2.2 Einfluss von Compound 21 auf die Genexpression von IL-6 in primären, bovinen, retinalen Perizyten bei Kultivation unter hyperglykämischen Bedingungen

Die 7-tägige Kultivierung der Zellen in erhöhter Glukosekonzentration ließ die IL-6 mRNA Expression signifikant um etwa 220 % gegenüber der basalen Expression in Perizyten ansteigen. Dieser Anstieg ließ sich signifikant durch Stimulation mit Compound 21 senken. PD 121339 konnte diesen Effekt nicht statistisch signifikant antagonisieren. (siehe Abb. 25).

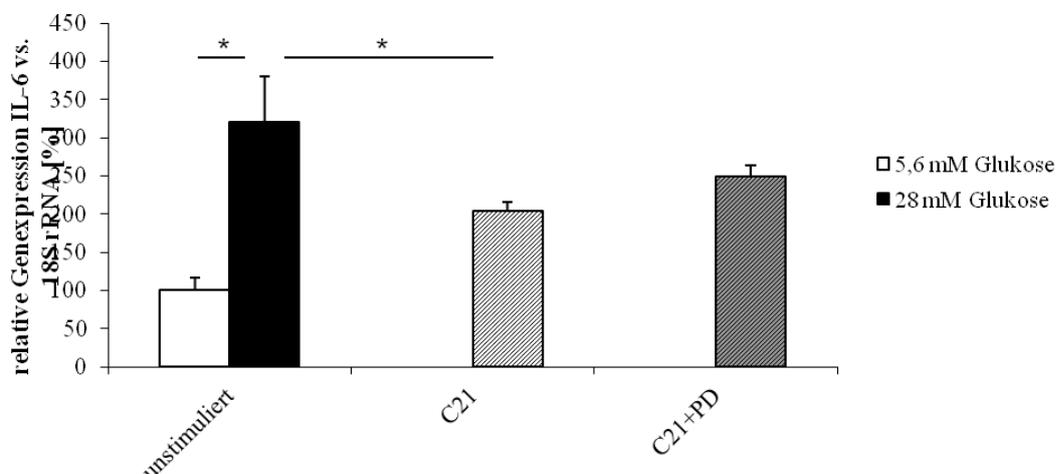


Abb. 25: Einfluss von Compound 21 auf die Expression von IL-6 in Perizyten unter hyperglykämischen Bedingungen

Perizyten wurden 7 Tage in 28 mM Glukose kultiviert. Daraufhin erfolgte die 6-stündige Stimulation mit 10^{-6} M Compound 21 (C21) und 10^{-5} M PD 121339 (PD). Die Ergebnisse sind in Relation zur Kontrolle (unstimulierte Zellen in 5,6 mM Glukose) dargestellt (Kontrolle = 100%) (* $p < 0,05$).

3.2.3.2.3 Einfluss von Compound 21 auf die Genexpression von Caspase-3 und Bax in primären, bovinen, retinalen Perizyten bei Kultivation unter hyperglykämischen Bedingungen

Die Behandlung mit Compound 21 ergab eine signifikante Reduktion der durch die erhöhte Glukosekonzentration verursachten verstärkten Caspase-3 mRNA Expression um etwa 42 %. PD 121339 konnte diesen Effekt nicht signifikant hemmen (siehe Abb. 26).

Auch die glukosebedingte vermehrte Bax mRNA Expression konnte durch den AT_2 -Rezeptoragonisten Compound 21 signifikant reduziert, durch den Antagonisten PD 121339 jedoch nicht signifikant aufgehoben werden. (siehe Abb. 27).

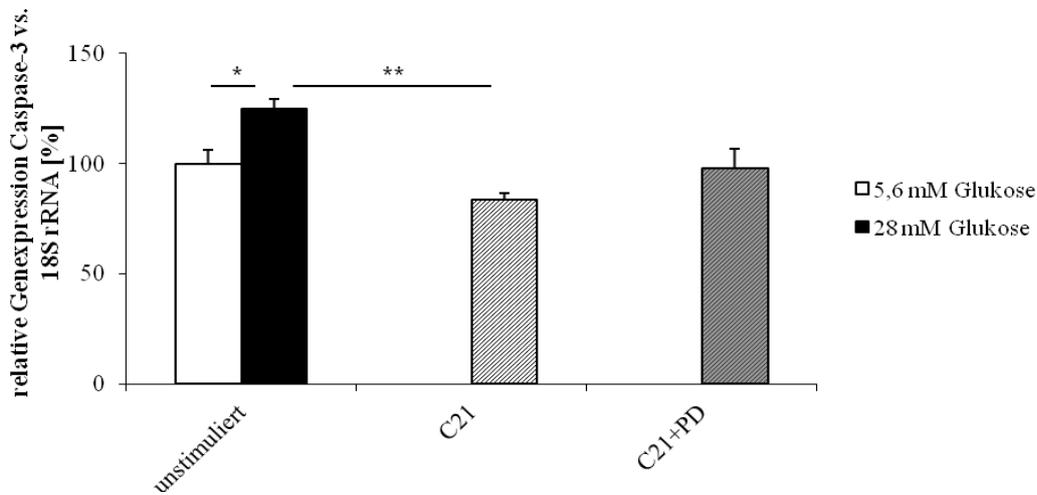


Abb. 26: Einfluss von Compound 21 auf die Expression von Caspase-3 in Perizyten unter hyperglykämischen Bedingungen

Perizyten wurden 7 Tage in 28 mM Glukose kultiviert. Daraufhin erfolgte die 6-stündige Stimulation mit 10^{-6} M Compound 21 (C21) und 10^{-5} M PD 121339 (PD). Die Ergebnisse sind Relation zur Kontrolle (unstimulierte Zellen in 5,6 mM Glukose) dargestellt (Kontrolle = 100%) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$).

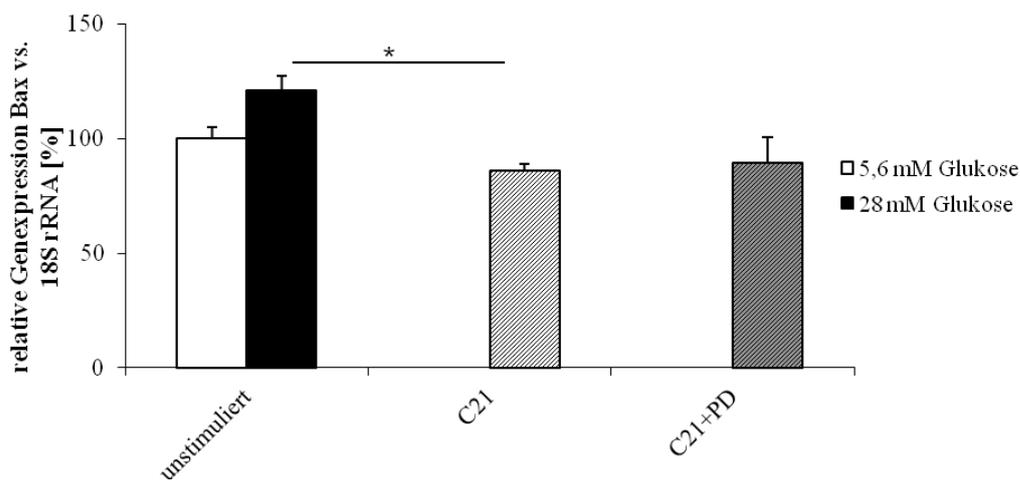


Abb. 27: Einfluss von Compound 21 auf die Expression von Bax in Perizyten unter hyperglykämischen Bedingungen

Perizyten wurden 7 Tage in 28 mM Glukose kultiviert. Daraufhin erfolgte die 6-stündige Stimulation mit 10^{-6} M Compound 21 (C21) und 10^{-5} M PD 121339 (PD). Die Ergebnisse sind in Relation zur Kontrolle (unstimulierte Zellen in 5,6 mM Glukose) dargestellt (Kontrolle = 100%) (* $p < 0,05$).

4 Diskussion

Die häufigste mikrovaskuläre Komplikation des Diabetes mellitus ist die diabetische Retinopathie. In Industrieländern ist sie nach wie vor die Hauptursache für neu auftretende Erblindungen von Erwachsenen im erwerbstätigen Alter. Der Bedarf nach einer präventiven oder zumindest unterstützenden pharmakologischen Therapie erscheint als immer dringender (Funatsu et al., 2003).

Perizyten sind maßgeblich an frühen pathologischen Veränderungen in der Retina bei diabetischer Retinopathie beteiligt (Ejaz et al., 2008). Auch die Rolle des Renin-Angiotensin-Systems bei der Entwicklung diabetischer Gefäßveränderungen gelangte in den Vordergrund gegenwärtiger Forschung und stellt einen möglichen Angriffspunkt neuer Therapiemöglichkeiten dar (Strain et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde daher an primären, bovinen, retinalen Perizyten *in vitro* untersucht, inwieweit sich Glukose-induzierte Veränderungen in Perizyten durch den Einsatz des AT₁-Rezeptorblockers Candesartan oder des AT₂-Rezeptoragonisten Compound 21 therapeutisch beeinflussen lassen. Eine diabetische Stoffwechsellage wurde durch die Kultivation der Zellen in Medien mit erhöhter Glukosekonzentration simuliert.

4.1 Einfluss von Angiotensin II auf die Expression von Angiogenese-, Inflammations- und Apoptoseparametern in primären, bovinen, retinalen Perizyten

Die Idee von der Existenz eines lokalen Renin-Angiotensin-Systems (RAS) im Auge wurde bereits von vielen Arbeitsgruppen aufgegriffen und untersucht. So identifizierte man im Auge alle wichtigen Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems. Auf zellulärer Ebene wurden die Komponenten in fetalen und adulten Nagetieren detektiert (Wilkinson-Berka, 2006). Mittels der Methode der quantitativen *Real-Time* PCR konnte auch in der humanen Retina ein lokales RAS identifiziert werden (Wagner et al., 1996). Vor allem die genaue Lokalisation der Angiotensinrezeptoren im Auge war von besonderer Bedeutung. In einigen Spezies wurden sowohl der AT₁- als auch der AT₂-Rezeptor auf Neuronen, Gliazellen und auf Gefäßzellen des Auges identifiziert (Nagai et al., 2005; Sarlos et al., 2003). Nadal et al. beschrieben die Expression beider Rezeptoren in Retinaperizyten vom Rind (Nadal et al., 2002).

Den Komponenten des lokalen aber auch des zirkulierenden Renin-Angiotensin-Systems wird eine bedeutende Rolle bei der Pathogenese der diabetischen Retinopathie zugeschrieben. Dies wird durch eine wachsende Anzahl von Studien belegt. So fanden sich erhöhte Spiegel an

Prorenin, Renin und Angiotensin II in den Glaskörpern von an proliferativer diabetischer Retinopathie und Makulaödem erkrankten Patienten (Danser et al., 1989).

Das wichtigste Effektorpeptid des Renin-Angiotensin-Systems ist das Angiotensin II. In dieser Arbeit sollte daher überprüft werden, ob durch Stimulation mit Angiotensin II die Expression von Markern, die eine entscheidende Rolle bei der Entstehung diabetischer Gefäßveränderungen spielen, induziert werden kann.

4.1.1 Einfluss von Angiotensin II auf die Expression von VEGF

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine 6-stündige Inkubation der retinalen Perizyten mit Angiotensin II zu einem signifikanten Anstieg (um ca. 290 %) der VEGF Expression führte. Da der AT₁-Rezeptorantagonist Candesartan diese Mehrproduktion bis fast auf den Ausgangswert zurück reduzierte, kann man annehmen, dass die Angiotensin II induzierte VEGF Expression über den AT₁-Rezeptor vermittelt wird. Otani et. al konnten ebenfalls eine Angiotensin II induzierte VEGF Expression in Perizyten zeigen (Otani et al., 2000). Williams et al. beobachten in ihren *in vitro* Versuchen die stimulierende Wirkung von Angiotensin II auf die VEGF Expression in glatten Muskelzellen (Williams et al., 1997). Darüber hinaus unterstreichen *in vivo* Studien die fördernde Wirkung von Angiotensin II auf die VEGF Expression in der Retina. So konnte in der Studie von Gilbert et al. mittels des Einsatzes eines ACE Inhibitors die diabetesbedingte vermehrte Expression von VEGF gesenkt werden (Gilbert et al., 2000). Eine direkte Beziehung zwischen dem Renin-Angiotensin-System und dem Wachstumsfaktor VEGF erscheint somit als sehr wahrscheinlich. VEGF führt am Gefäßsystem zu einer Reihe von Reaktionen, wie Endothelzellproliferation, Angiogenese, Vasodilatation und Hyperpermeabilität (Caldwell et al., 2003). Dies bestärkt die Annahme, dass eine Angiotensin II induzierte VEGF Produktion eine entscheidende Schlüsselrolle bei der erhöhten Gefäßpermeabilität im Rahmen der diabetischen Retinopathie und bei dem Auftreten von Neovaskularisierungserscheinungen, die ein typisches Charakteristikum der proliferativen diabetischen Retinopathie sind, spielt.

4.1.2 Einfluss von Angiotensin II auf die Expression von IL-6

Das pro-inflammatorische Zytokin IL-6 hat eine Vielzahl von biologischen Funktionen und scheint auch bei der Pathogenese der diabetischen Retinopathie beteiligt zu sein. So zeigten sich erhöhte Level an IL-6 in der Glaskörperflüssigkeit von diabetischen Patienten (Mocan et al., 2006).

Die proinflammatorische Wirkung von Angiotensin II auf das Gefäßsystem wurde bereits von einigen Arbeitsgruppen beschrieben (Marchesi et al., 2008). Auch in der vorliegenden Arbeit

fürte die 6-stündige Stimulation mit Angiotensin II zu einem signifikanten Anstieg der IL-6 Expression, welche durch den AT₁-Rezeptorblocker Candesartan deutlich reduziert werden konnte. Obwohl keine statistische Signifikanz erreicht wurde, kann man auf Grund der deutlichen Hemmung der IL-6 Expression und zahlreicher entsprechender Publikationen (Sano et al., 2000; Rompe et al., 2010) trotzdem davon ausgehen, dass die inflammatorische Wirkung von Angiotensin II durch den AT₁-Rezeptor vermittelt wird. Funakoshi et al. und Han et al. zeigten bereits eine ähnliche Wirkung des Angiotensins II auf die IL-6 Expression, allerdings in glatten Muskelzellen der Ratte (Funakoshi et al., 1999; Han et al., 1999).

4.1.3 Einfluss von Angiotensin II auf die Expression von Caspase-3 und Bax

Eine der vielen beschriebenen Angiotensin II Wirkungen stellt die Induktion der Apoptose dar (Bonnet et al., 2001). Die Rolle der beiden Angiotensinrezeptoren AT₁ und AT₂ dabei wird kontrovers diskutiert. Es gibt eine Reihe an Studien, die eine AT₂-Rezeptor vermittelte Aktivierung der Apoptose in unterschiedlichen Zelltypen beobachteten. In einigen *in vitro* Studien mit Myozyten und koronaren Endothelzellen dagegen wurde der AT₁-Rezeptor für die apoptotischen Prozesse verantwortlich gemacht (Li et al., 1999; Leri et al., 2000). Durvasula et al. beobachteten an differenzierten murinen Podozyten eine proapoptotische Wirkung von Angiotensin II. Dieser Effekt war ebenso wie die durch die mechanische Belastung hervorgerufene Apoptose durch AT₁-Blockade signifikant reduzierbar (Durvasula et al., 2004). Auch in der vorliegenden Arbeit zeigen sich Hinweise für eine AT₁-Rezeptor-vermittelte Apoptose. So war die Expression des Apoptosemarkers Caspase-3 nach einer 6-stündigen Inkubation der Perizyten mit Angiotensin II um etwa 96 % gesteigert. Die Vorinkubation mit dem AT₁-Rezeptorantagonisten Candesartan konnte diese Induktion signifikant inhibieren. Dass die Bax Expression durch die Stimulation mit Angiotensin II nicht wesentlich beeinflusst wurde und die gleichzeitige Inkubation mit Candesartan eine Reduzierung der Bax Expression bewirkte, könnte auf eine endogene Angiotensin II Produktion der Perizyten zurückzuführen sein.

In den vorliegenden Versuchen führte die Inkubation der Perizyten mit Angiotensin II zu einer verstärkten mRNA-Expression von VEGF, IL-6 und des proapoptotischen Markers Caspase-3. Diese Ergebnisse stehen damit im Einklang mit bereits publizierten Arbeiten, die zeigten, dass Angiotensin II als wesentlicher pathogener Faktor bei der Herausbildung typischer Charakteristika der diabetischen Retinopathie, wie zum Beispiel Neovaskularisierung,

Inflammation und Apoptose, angesehen werden kann (Danser et al., 1994, 1989; Sjølie et al., 2002; Wilkinson-Berka, 2006).

4.2 Die Effekte der Hyperglykämie im *in vitro* Modell der diabetischen Retinopathie

Die chronische Hyperglykämie ist ein bedeutender pathogener Faktor bei der Entstehung typischer Charakteristika der diabetischen Retinopathie. Sie kann für viele frühe Zeichen der diabetischen Retinopathie, beispielsweise die Mikroaneurysmen, die Membranverdickung, die erhöhte Gefäßpermeabilität und der Veränderung des Blutflusses, verantwortlich gemacht werden (Khan et al., 2007). Ein deutlicher Anstieg von Wachstumsfaktoren und Zytokinen zeigt sich bereits nach einer kurzen Diabetesdauer (Sone et al., 1997; Chou et al., 2002). Um in der vorliegenden Arbeit die Auswirkung einer erhöhten Glukosekonzentration im Medium zu untersuchen, wurden die Zellen in Medium mit einer Glukosekonzentration von 28 mM kultiviert.

4.2.1 Einfluss der Hyperglykämie auf die Expression von VEGF

VEGF kann als ein entscheidender Mediator bei der Herausbildung diabetischer Gefäßveränderungen angesehen werden (Caldwell et al., 2003). So fanden sich erhöhte intraokuläre VEGF Level bei Patienten mit einer diabetischen Retinopathie (Aiello et al., 1994). Auch in diabetischen Tiermodellen konnte ein Anstieg der VEGF Expression festgestellt werden (Sone et al., 1997).

In der vorliegenden Arbeit erbrachte die Kultivierung der Zellen unter hyperglykämischen Bedingungen einen kontinuierlichen Expressionsanstieg von VEGF gegenüber den unter normoglykämischen Bedingungen kultivierte Zellen. Dabei kam es nach 7 Tagen Kultivation mit einer erhöhten Glukosekonzentration ungefähr zu einer Verdopplung der VEGF Expression. Ähnliche Resultate wurden auch in einer Studie von Kane et al. beschrieben, in der eine 7-tägige 30 mM Glukosebehandlung von Retinaperizyten einen Anstieg der VEGF Expression bewirkte (Kane et al., 2005).

4.2.2 Einfluss der Hyperglykämie auf die Expression von IL-6

Die Bedeutung von Inflammationsparametern, vor allem der Interleukine, bei der Pathogenese der diabetischen Retinopathie ist ebenfalls Gegenstand der wissenschaftlichen Diabetesforschung. Tatsächlich fanden sich erhöhte Level von IL-6 und IL-8 in der

Glaskörperflüssigkeit von Patienten mit einer proliferativen diabetischen Retinopathie (Yuuki et al., 2001). Auch in experimentellen Studien mit diabetischen Ratten und Mäusen wurde eine vermehrte Bildung von Interleukinen beschrieben (Carmo et al., 1999; Kowluru et al., 2004). Die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse zur IL-6 Expression unterstützen die in der Literatur gemachten Aussagen. So führte die über siebentägige Inkubation der Zellen mit 28 mM Glukose zu einem signifikanten Anstieg der IL-6 Expression im Vergleich zu Zellen, die in normoglykämischen Medium kultiviert wurden. Interessanterweise konnte bereits nach eintägiger erhöhter Glukosebehandlung eine Verdopplung der IL-6 Expression festgestellt werden. Diese fiel allerdings nach weiterer eintägiger Behandlung fast bis auf den Ausgangswert zurück. Ab einer dreitägigen Behandlung war wieder ein kontinuierlicher Anstieg zu beobachten. Mehrere Stoffwechselwege, wie die Bildung von *Advanced Glycation Endproducts* sowie die Aktivierung der Proteinkinase C, werden bei Anwesenheit einer chronischen Hyperglykämie induziert. Diese aktivieren wiederum über verschiedenste Wege und mit unterschiedlichen Zeitverläufen das Zytokinnetzwerk. Die beobachteten Peaks der IL-6 Expression nach ein- und siebentägiger Glukosebehandlung könnten somit Ausdruck dieser unterschiedlichen biochemischen Abläufe sein.

4.2.3 Einfluss der Hyperglykämie auf die Expression von Caspase-3 und Bax

Der Perizytenverlust stellt ein frühes Zeichen der diabetischen Retinopathie dar. Dabei sehen Mizutani et al. den apoptotischen Prozess als einen grundlegenden Mechanismus des Zellverlustes an (Mizutani et al., 1996b).

An der Apoptose sind in entscheidender Art und Weise spezielle Proteasen beteiligt (die Caspasen), die Bcl-2-Familie (bestehend aus einer Gruppe von Regulatorproteinen) sowie die Mitochondrien der Zelle (Reed, 2000). Caspasen sind proteolytisch aktive Enzyme und stellen die eigentlichen Exekutoren der Apoptose dar. Während der sogenannten Caspase-Kaskade können sich diese Enzyme gegenseitig aktivieren. Die aktivierten Effektor-Caspasen, zu denen vor allem die Caspasen-3, -6 und -7 zählen, übernehmen die Ausführung des Todesprogramms. (Slee et al., 2001).

Um die Auswirkung einer Hyperglykämie auf die Expression von proapoptotischen Faktoren zu überprüfen, wurden die Perizyten wie in Abschnitt 2.2.2.2 beschrieben unterschiedlich lang einer 28 mM Glukosekonzentration ausgesetzt. Dabei zeigte sich ein kontinuierlicher Caspase-3 Expressionsanstieg über den untersuchten Zeitverlauf. Im Vergleich zur Kontrolle konnte nach 7-tägiger Inkubation eine Caspase-3 Expressionserhöhung um etwa 120 % beobachtet werden. Auch Kowluru und Koppolu beobachteten in ihren Versuchen apoptotische Effekte einer

chronischen Hyperglykämie. Endothelzellen und Perizyten, die für 5 Tage mit einer 25 mM Glukosekonzentration behandelt wurden, zeigten eine gesteigerte Caspase-3 Aktivität. Ebenso konnten sie in diabetischen Ratten eine erhöhte Caspase-3 Aktivität feststellen (Kowluru et al., 2002). Miwa et al. kamen zu ähnlichen Ergebnissen. So erbrachte eine 5-tägige Behandlung mit 20 mM Glukose einen signifikanten Anstieg der Caspase-3 Aktivität in Retinaperizyten vom Rind (Miwa et al., 2003). Anhand dieser Beobachtungen und der eigenen Ergebnisse scheint der Caspase-3-Weg einen entscheidenden Anteil am Apoptoseprozess der diabetischen Retinopathie einzunehmen.

Die Mitochondrien der Zelle spielen bei der intrinsischen Apoptoseinduktion eine entscheidende Rolle. Sie können selbstständig oder aufgrund einer Porenbildung durch proapoptotische Proteine der Bcl-2-Familie den Zelltod hervorrufen (Kroemer et al., 2000). Prinzipiell kann man die Bcl-2-Familienmitglieder in zwei Gruppen gliedern, in die pro- und die antiapoptotisch wirksamen Proteine. Zu den proapoptotischen Mitgliedern zählt unter anderem das in dieser Arbeit aufgeführte Bax. In den durchgeführten Versuchen konnte bereits nach zwei Tagen Behandlung mit 28 mM Glukose ein signifikanter Anstieg der Bax Expression verzeichnet werden. Nach dreitägiger Inkubation fiel die Bax Expression ab, eine weitere 4-tägige Glukosestimulation zeigte wieder einen Anstieg der Expression. Auch andere Arbeitsgruppen konnten bereits einen positiven Zusammenhang zwischen Hyperglykämie und der Bax Expression nachweisen. So beschrieben Romeo et al. bei Perizyten einen signifikanten Anstieg der Bax Expression nach einwöchiger Behandlung mit 25 mM Glukose (Romeo et al., 2002). Podestà et al. sahen erst nach einer dreiwöchigen Inkubationsperiode einen deutlichen Anstieg der Bax Expression in Perizyten. Außerdem stellten sie erhöhte Bax Level in der Retina von diabetischen Patienten fest (Podestà et al., 2000). Auch das proapoptotische Protein Bax scheint demnach eine bedeutende Rolle beim Zelltod von Perizyten, einem typischen Charakteristikum diabetischer Gefäßveränderungen, einzunehmen.

4.3 Effekte einer pharmakologischen Interferenz mit dem Renin-Angiotensin-System im *in vitro* Modell der diabetischen Retinopathie

4.3.1 Einfluss des AT₁-Rezeptorantagonisten Candesartan auf die Expression von Angiogenese-, Inflammations- und Apoptoseparametern in primären, bovinen, retinalen Perizyten bei Kultivation unter hyperglykämischen Bedingungen

Die Hyperglykämie-induzierte RAS-Aktivierung führt wie bereits beschrieben zu einer vermehrten Bildung von angiogenen, inflammatorischen und proapoptotischen Mediatoren, die

letztendlich die Gefäßveränderungen der diabetischen Retinopathie bewirken. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb untersucht, inwieweit sich Hyperglykämie-bedingte Veränderungen in Perizyten durch Behandlung mit dem AT₁-Rezeptorblocker Candesartan therapeutisch beeinflussen lassen. Tatsächlich konnte Candesartan die Glukose-induzierte Mehrexpression von VEGF in Perizyten signifikant reduzieren. Ähnliche Effekte zeigte Candesartan auch für die Expression von IL-6, Caspase-3 und Bax. Dabei verringerte Candesartan die Glukose-induzierte Mehrproduktion von IL-6 und Bax signifikant, die Senkung der Caspase-3 Expression verfehlte eine Signifikanz nur knapp. Hierbei ist zu erwähnen, dass eine 7-tägige Inkubation in Medium mit hoher Glukosekonzentration keine statistisch signifikante Mehrexpression von Bax erbrachte. In den vorangegangenen Versuchen zur Ermittlung einer optimalen Inkubationsdauer der Perizyten in Medium mit hoher Glukosekonzentration hatte sich bereits gezeigt, dass eine 7-tägige Inkubation kein idealer Zeitpunkt zur Messung von Bax sein würde, da auch in den Vorversuchen die Steigerung der Bax Expression nach 7 Tagen nicht signifikant war. Unter Berücksichtigung aller zu messenden Marker schien diese Inkubationsdauer allerdings trotzdem die beste.

Die zusätzliche Behandlung mit Angiotensin II führte zu keiner weiteren, signifikanten Erhöhung der Glukose-bedingten Mehrexpression von VEGF, IL-6 und Bax. Die sich dargestellte Reduktion der Bax Expression ist allerdings wegen der sehr hohen Standardabweichung trotz Signifikanz mit Vorsicht zu bewerten. Die Mehrexpression von Caspase-3 dagegen erhöhte sich additiv durch den Zusatz von Angiotensin II. Im Gegensatz zu der offensichtlich angiogenen, inflammatorischen und proapoptotischen Wirkung von Angiotensin II auf die unter normoglykämischen Bedingungen kultivierte Zellen (siehe 4.1) zeigte Angiotensin II nur eine eingeschränkte zusätzlich schädigende Wirkung auf Perizyten, die unter hyperglykämischen Bedingungen kultiviert wurden. Dies könnte man auf eine Hyperglykämie-bedingte eigenständige Angiotensin II-Produktion der Perizyten zurückführen. Studien anderer Gruppen zeigten bereits eine vermehrte Bildung von einzelnen Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems unter hyperglykämischen Zuständen (Danser et al., 1994, 1989; Franken et al., 1988). Dass aber Perizyten dazu befähigt sind, in einer diabetischen Stoffwechsellaage vermehrt Angiotensin II zu bilden, muss noch experimentell bewiesen werden. Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit die Blockierung des AT₁-Rezeptors mit dem spezifischen Antagonisten Candesartan der Glukose-induzierten Mehrexpression von VEGF IL-6 und Bax entgegenwirken. An dieser Stelle sei betont, dass für den Effekt von Candesartan keine vorherige Stimulation mit Angiotensin II notwendig war, sondern dass die Überproduktion der untersuchten Marker alleine Glukose-induziert war. Es gibt bereits eine Reihe von

experimentellen Studien, in denen die Bedeutung einer Renin-Angiotensin-System Blockade im Kontext der diabetischen Retinopathie untersucht wurde. So zeigten die in der Studie von Moravski et al. einer relativen Hypoxie ausgesetzten neugeborenen Ratten die für die diabetische Retinopathie typische retinale Neovaskularisation. Wurden diese Tiere frühzeitig mit Hemmstoffen des Renin-Angiotensin-Systems, das heißt mittels des ACE Inhibitors Lisinopril oder des AT₁-Rezeptorantagonisten Losartan behandelt, traten diese Veränderungen nicht auf (Moravski et al., 2000). In spontan hypertensiven Ratten, bei denen durch die Gabe von Streptozotocin ein Diabetes induziert wurde, führte die Gabe des AT₁-Rezeptorantagonisten Candesartan zu einer Reduktion der Diabetes-bedingten retinalen Veränderungen (Nagisa et al., 2001). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch in unserer Arbeitsgruppe. In *in vivo* Versuchen an Ratten mit Streptozotocin-induziertem Diabetes mellitus führte die Gabe von Candesartan zu einer Reduktion von Apoptosemediatoren und zu einer Induktion von Neurotrophinen in retinalem Gewebe (Steckelings et al., 2009). In der Studie von Horio et al. beugte die Candesartanbehandlung von diabetischen Ratten dem für die Diabetes-bedingte Gefäßveränderung typischen, verlangsamten, retinalen Blutfluss vor (Horio et al., 2004). Interessanterweise wurde kürzlich dem AT₁-Rezeptorblocker Candesartan auch die Eigenschaft als direktes Antioxidans zugeschrieben. So reduzierte Candesartan in hoher Dosierung *in vitro* die TNF- α -induzierte Chemokinfreisetzung und ROS-Bildung sowie die TNF- α -induzierte NF- κ B-Aktivierung unabhängig von einer AT₁-Rezeptor-Blockade (Chen et al., 2008).

Seit 1990 wird auch in verschiedenen klinischen Studien die Bedeutung der RAS-Blockade untersucht. Neben einer Reihe von kleineren Studien an Typ-1 Diabetikern (Chase et al., 1993; Larsen et al., 1990) wurden auch zwei größere Studien zur potentiellen präventiven beziehungsweise therapeutischen Wirksamkeit einer RAS-Blockade bei diabetischer Retinopathie durchgeführt. Die EUCLID-Studie untersuchte die Renin-Angiotensin-System-Blockade durch den ACE-Hemmer Lisinopril (Chaturvedi et al., 1998). Lisinopril führte in dieser Studie zu einer signifikanten Reduktion der Progression der diabetischen Retinopathie und Reduktion der Progression von einer nicht-proliferativen in eine proliferative Form; jedoch waren diese Studienpunkte in EUCLID nur sekundärer Endpunkt. Darüber hinaus wurde die Wirkung einer vorbeugenden Therapie mit dem AT₁-Blocker Candesartan auf das Voranschreiten der diabetischen Retinopathie in einer internationalen klinischen Studie unter Einschluss von über 5000 Patienten (DIRECT – „The DIabetic RETinopathy Candesartan Trials Programme“) untersucht. Dabei handelt es sich um die bisher größte Studie zum Einsatz von RAS-blockierenden Substanzen bei der diabetischen Retinopathie (Chaturvedi et al., 2002). Die Studienergebnisse bestärken die positiven Effekte von Candesartan bei Diabetikern. Hierbei

konnte eine Behandlung mit Candesartan bei normotensiven Typ 1 Diabetiker die Inzidenz einer diabetischen Retinopathie im Beobachtungszeitraum reduzieren, während bei normo- und hypertensiven Typ 2 Diabetikern eine Regression bei schon bestehender Retinopathie zu beobachten war (Chaturvedi et al., 2008; Sjølie et al., 2008). Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse scheint der Einsatz von Candesartan somit neue therapeutische beziehungsweise präventive Chancen für den Diabetiker zu eröffnen.

4.3.2 Einfluss des AT₂-Rezeptoragonisten Compound 21 auf die Expression von Angiogenese-, Inflammations- und Apoptoseparametern in primären, bovinen, retinalen Perizyten bei Kultivation unter hyperglykämischen Bedingungen

Dank der Neuentwicklung des nicht-peptidischen, spezifischen und selektiven AT₂-Rezeptoragonisten Compound 21 konnten in dem bereits beschriebenen Zellkulturmodell (siehe 2.2.2.3) erstmals die Effekte einer direkten AT₂-Rezeptor-Stimulation auf die Glukose-induzierte pathologische Mechanismen in Zellen retinalen Ursprungs untersucht werden.

Wie zu erwarten steigerte die einwöchige Inkubation mit 28 mM Glukose die mRNA Expression des Wachstumsfaktors VEGF signifikant. Dieser Anstieg ließ sich durch die 6-stündige Inkubation mit Compound 21 aufheben. Der hemmende Effekt der AT₂-Rezeptor-Stimulation auf die mRNA-Expression konnte durch Ko-Inkubation mit dem spezifischen AT₂-Rezeptorantagonisten PD 123319 signifikant inhibiert werden, was dafür spricht, dass die Effekte von Compound 21 in der Tat AT₂-Rezeptor vermittelt sind. Die durch den Einsatz von Compound 21 verminderte VEGF Expression könnte man als einen Mechanismus interpretieren, der einer pathologischen Neovaskularisierung entgegenwirkt. Stoll et al. beobachteten bereits einen antiproliferativen Effekt des AT₂-Rezeptors in koronaren Endothelzellen (Stoll et al., 1995). Unsere und andere Arbeitsgruppen konnten daraufhin diese Ergebnisse auf Rinder-Endothelzellen der Aorta, humane Endothelzellen der Haut und Zellen neuronaler Herkunft ausweiten (Fischer et al., 2001; Laflamme et al., 1996; Meffert et al., 1996b; Nakajima et al., 1995; Tsutsumi et al., 1999). Im Gegensatz dazu beobachteten Sarlos et al. in einem diabetischen Tiermodell einen antiproliferativen Effekt bei AT₂-Rezeptor-Blockade (Sarlos et al., 2003). Weitere Studien sind jedoch erforderlich, um die schützende Rolle des AT₂-Rezeptors bei der diabetischen Retinopathie näher zu charakterisieren. Eine therapeutische Eindämmung der Neovaskularisierung könnte ein entscheidender Weg zur Prävention der proliferativen diabetischen Retinopathie und Verhinderung weiterer Progression darstellen.

Auch die Glukose-bedingte Mehrexpression des Inflammationsparameters IL-6 konnte durch den AT₂-Rezeptoragonisten Compound 21 signifikant reduziert werden. Die gleichzeitige AT₂-

Rezeptorantagonisierung verringerte den Compound 21 Effekt, jedoch nicht signifikant. Ein möglicher Signaltransduktionsweg der antiinflammatorischen Wirkung von Compound 21 könnte die Aktivitätsminderung von NF- κ B darstellen, die zu einer verminderten Transkription proinflammatorischer Zytokine führt. So konnten Untersuchungen innerhalb unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass Compound 21 in primären, humanen Fibroblasten der Haut die TNF- α induzierte Aktivität von NF- κ B hemmt und dadurch die Transkription von IL-6 vermindert (Rompe et al., 2010). Ein antiinflammatorischer Effekt von Compound 21 konnte auch in von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten *in vivo* Versuchen mit Ratten, die einem Myokardinfarkt ausgesetzt wurden, beobachtet werden (Kaschina et al., 2008).

Die 6-stündige AT₂-Rezeptor-Stimulation mit Compound 21 bewirkte weiterhin einen inhibierenden Effekt auf die Glukose-induzierte Mehrexpression von Caspase-3 und Bax. PD 123319 konnte jedoch keine statistisch signifikante Hemmung des Effekts von Compound 21 erreichen. Eine inkomplette Hemmung von AT₂-Rezeptor vermittelten Effekten mit dem Antagonisten PD 123319 ist ein in der Literatur häufig beschriebenes und auch in unseren eigenen Versuchen häufig auftretendes Phänomen. Es ist zum Beispiel deutlich sichtbar in der Abbildung 5 von Dhande et al. oder Abbildung 2 von Matavelli et al. (Dhande et al., 2013; Matavelli et al., 2011). Wahrscheinlich ist eine partiell agonistische Wirkung von PD 123319 dafür verantwortlich, dass der Effekt von AT₂-Rezeptoragonisten oftmals nur inkomplett inhibiert wird.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen eine antiapoptotische Wirkweise von Compound 21 vermuten. Im Gegensatz dazu findet man in der Literatur *in vitro* Studien mit PC12W Zellen, Ratten-Granulosazellen des Ovars und Rattenzellen neuronaler Herkunft, die proapoptotische Effekte des AT₂-Rezeptors beschreiben (Tanaka et al., 1995; Yamada et al., 1996; Shenoy et al., 1999). Auch löste in humanen Endothelzellen aus der Nabelschnur die Stimulation des AT₂-Rezeptors eine Aktivierung von Caspase-3 aus, welche schließlich zu einer verstärkten Apoptose führte (Dimmeler et al., 1997). In *in vivo* Versuchen unserer Arbeitsgruppe dagegen konnte der AT₂-Rezeptoragonist Compound 21 die Myokardinfarkt assoziierte Caspase-3 Expression senken und somit eine verstärkte Apoptose der Kardiomyozyten vorbeugen (Kaschina et al., 2008).

In der vorliegenden Arbeit konnten in einem *in vitro* Modell der diabetischen Retinopathie durch die direkte Stimulation des AT₂-Rezeptors mit dem spezifischen AT₂-Rezeptoragonisten Compound 21 gewebeprotective Mechanismen ausgelöst werden. Compound 21 zeigte in Perizyten antiinflammatorische und antiapoptotische Effekte und hemmte die Expression des

Schlüsselmarkers der Retinopathie, VEGF. Compound 21 könnte somit für die Zukunft eine potentielle therapeutische Möglichkeit zur Behandlung der diabetischen Retinopathie darstellen.

5 Zusammenfassung

Die diabetische Retinopathie ist die häufigste Folgeerkrankung des Diabetes mellitus und in Industrieländern nach wie vor die häufigste Ursache für neu auftretende Erblindungen von Erwachsenen im erwerbstätigen Alter. Bislang existiert noch keine zufriedenstellende, nicht-invasive Therapie.

Das Renin-Angiotensin-System spielt bei der Pathogenese diabetischer Gefäßveränderungen eine entscheidende Rolle. Die Blockade des Renin-Angiotensin-Systems mit ACE-Hemmern oder AT₁-Rezeptorblockern scheint sich günstig auf die diabetische Retinopathie auszuwirken. Molekulare Mechanismen, die dem protektiven Effekt einer AT₁-Rezeptorblockade in diesem Kontext zu Grunde liegen, sind bisher unzureichend beschrieben. Das therapeutische Potential des AT₂-Rezeptors bei der diabetischen Retinopathie ist ebenfalls noch weitgehend ungeklärt. Den Perizyten wird bei der Entstehung früher pathologischer Veränderungen in der Retina eine besondere Rolle zugeschrieben. Ziel dieser Arbeit war es daher, an primären, bovinen, retinalen Perizyten *in vitro* die therapeutische Beeinflussbarkeit von Hyperglykämie-bedingten pathologischen Veränderungen durch den Einsatz von AT₁-Rezeptorblockern oder AT₂-Rezeptoragonisten zu untersuchen.

Die Inkubation der Perizyten mit Angiotensin II induzierte signifikant die mRNA Expression von VEGF, IL-6 und des proapoptotischen Markers Caspase-3. Diese Ergebnisse bestätigen, wie bereits von anderen Gruppen publiziert, die Schlüsselrolle von Angiotensin II bei der Herausbildung typischer Charakteristika der diabetischen Retinopathie, wie zum Beispiel Neovaskularisierung, Inflammation und Apoptose. Zur Simulation der diabetischen Stoffwechsellage wurden die Zellen in Medium mit 28 mM Glukose kultiviert. Dabei führte die erhöhte Glukosekonzentration zeitabhängig zu einer verstärkten Expression von VEGF, IL-6, Caspase-3 und Bax. Die Blockierung des AT₁-Rezeptors mit dem spezifischen Antagonisten Candesartan konnte der Glukose-induzierten Mehrexpression von VEGF, IL-6 und Bax entgegenwirken. Die Neuentwicklung des nicht-peptidischen, spezifischen und selektiven AT₂-Rezeptoragonisten Compound 21 ermöglichte es, erstmals die Effekte einer direkten AT₂-Rezeptor-Stimulation auf die Glukose-induzierten pathologischen Mechanismen in Zellen retinalen Ursprungs zu untersuchen. Dabei konnte die Hyperglykämie-bedingte Mehrexpression von VEGF, IL-6, Caspase-3 und Bax signifikant gesenkt werden. Die direkte Stimulation des AT₂-Rezeptors inhibierte alle Glukose-induzierten Prozesse und löste somit gewebeprotective Mechanismen aus. Darüber hinaus ließ sich eine inkomplette Hemmung von AT₂-Rezeptor vermittelten Effekten mit dem Antagonisten PD 123319 beobachten, ein in der Literatur häufig

beschriebenes und auch in unseren eigenen Versuchen häufig auftretendes Phänomen. Wahrscheinlich ist eine partiell agonistische Wirkung von PD 123319 dafür verantwortlich, dass der Effekt von AT₂-Rezeptoragonisten oftmals nur inkomplett inhibiert wird.

Zusammenfassend deuten alle Ergebnisse daraufhin, dass der pharmakologische Eingriff in das Renin-Angiotensin-System ein entscheidendes therapeutisches Potential bei der diabetischen Retinopathie hat. Der Einsatz von AT₁-Rezeptorblockern scheint eine potentielle therapeutische Möglichkeit zur Behandlung und Prävention der diabetischen Retinopathie darzustellen. Auch die therapeutische Beeinflussung des Renin-Angiotensin-Systems mittels direkter Stimulation des AT₂-Rezeptors könnte perspektivisch therapeutische Chancen für den Diabetiker eröffnen.

6 Literaturverzeichnis

- Adamis AP, Shima DT, Yeo KT, et al. Synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;193:631-8.
- Aguilera G, Kiss A. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and vasopressin secretion. Role of angiotensin II. *Adv Exp Med Biol* 1996;396:105-12.
- Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 1994;331:1480-7.
- Allt G, Lawrenson JG. Pericytes: cell biology and pathology. *Cells Tissues Organs* 2001;169:1-11.
- Barnard JA, Lyons RM, Moses HL. The cell biology of transforming growth factor beta. *Biochim Biophys Acta* 1990;1032:79-87.
- Behzadian MA, Wang XL, Al-Shabrawey M, Shabrawey M, Caldwell RB. Effects of hypoxia on glial cell expression of angiogenesis-regulating factors VEGF and TGF-beta. *Glia* 1998;24:216-25.
- Bonnet F, Cao Z, Cooper ME. Apoptosis and angiotensin II: yet another renal regulatory system? *Exp Nephrol* 2001;9:295-300.
- Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;414:813-20.
- Caldwell RB, Bartoli M, Behzadian MA, et al. Vascular endothelial growth factor and diabetic retinopathy: pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. *Diabetes Metab Res Rev* 2003;19:442-55.
- Carey RM, Wang ZQ, Siragy HM. Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. *Hypertension* 2000;35:155-63.
- Carmo A, Cunha-Vaz JG, Carvalho AP, Lopes MC. L-arginine transport in retinas from streptozotocin diabetic rats: correlation with the level of IL-1 beta and NO synthase activity. *Vision Res* 1999;39:3817-23.
- Chakrabarti S, Cukiernik M, Hileeto D, Evans T, Chen S. Role of vasoactive factors in the pathogenesis of early changes in diabetic retinopathy. *Diabetes Metab Res Rev* 2000;16:393-407.
- Chase HP, Garg SK, Harris S, Hoops S, Jackson WE, Holmes DL. Angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment for young normotensive diabetic subjects: a two-year trial. *Ann Ophthalmol* 1993;25:284-289.
- Chaturvedi N, Porta M, Klein R, et al. Effect of candesartan on prevention (DIRECT-Prevent 1) and progression (DIRECT-Protect 1) of retinopathy in type 1 diabetes: randomised, placebo-controlled trials. *Lancet* 2008;372:1394-1402.
- Chaturvedi N, Sjoelie AK, Svensson A. The DIabetic Retinopathy Candesartan Trials (DIRECT) Programme, rationale and study design. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2002;3:255-61.

- Chaturvedi N, Sjolie AK, Stephenson JM, et al. Effect of lisinopril on progression of retinopathy in normotensive people with type 1 diabetes. The EUCLID Study Group. EURODIAB Controlled Trial of Lisinopril in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Lancet* 1998;351:28-31.
- Chen S, Ge Y, Si J, Rifai A, Dworkin LD, Gong R. Candesartan suppresses chronic renal inflammation by a novel antioxidant action independent of AT1R blockade. *Kidney Int* 2008;74:1128-1138.
- Chou E, Suzuma I, Way KJ, et al. Decreased cardiac expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in insulin-resistant and diabetic States: a possible explanation for impaired collateral formation in cardiac tissue. *Circulation* 2002;105:373-9.
- Clermont A, Bursell S, Feener EP. Role of the angiotensin II type 1 receptor in the pathogenesis of diabetic retinopathy: effects of blood pressure control and beyond. *Journal of Hypertension. Supplement: Official Journal of the International Society of Hypertension* 2006;24:S73-80.
- Danne T, Kordonouri O, Hövener G, Weber B. Diabetic angiopathy in children. *Diabet Med* 1997;14:1012-25.
- Danser AH, Derkx FH, Admiraal PJ, Deinum J, de Jong PT, Schalekamp MA. Angiotensin levels in the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:1008-18.
- Danser AH, van den Dorpel MA, Deinum J, et al. Renin, prorenin, and immunoreactive renin in vitreous fluid from eyes with and without diabetic retinopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;68:160-7.
- Dhande I, Ali Q, Hussain T. Proximale Tubule Angiotensin AT₂ Receptors Mediate an Anti-Inflammatory Response via Interleukin-10: Role in Renoprotection in Obese Rats. *Hypertension* 2013; 61:00-00.
- Dimmeler S, Rippmann V, Weiland U, Haendeler J, Zeiher AM. Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide. *Circ Res* 1997;81:970-6.
- Du XL, Edelstein D, Rossetti L, et al. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:12222-6.
- Durvasula RV, Petermann AT, Hiromura K, et al. Activation of a local tissue angiotensin system in podocytes by mechanical strain. *Kidney Int* 2004;65:30-9.
- Edelman DA, Jiang Y, Tyburski J, Wilson RF, Steffes C. Pericytes and their role in microvasculature homeostasis. *J Surg Res* 2006;135:305-11.
- Ejaz S, Chekarova I, Ejaz A, Sohail A, Lim CW. Importance of pericytes and mechanisms of pericyte loss during diabetes retinopathy. *Diabetes, Obesity & Metabolism* 2008;10:53-63.
- El-Remessy AB, Behzadian MA, Abou-Mohamed G, Franklin T, Caldwell RW, Caldwell RB. Experimental diabetes causes breakdown of the blood-retina barrier by a mechanism involving tyrosine nitration and increases in expression of vascular endothelial growth factor and urokinase plasminogen activator receptor. *Am J Pathol* 2003;162:1995-2004.
- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004;25:581-611.

- Fischer JW, Stoll M, Hahn AW, Unger T. Differential regulation of thrombospondin-1 and fibronectin by angiotensin II receptor subtypes in cultured endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2001;51:784-91.
- Franken AA, Derkx FH, Schalekamp MA, et al. Association of high plasma prorenin with diabetic retinopathy. *J Hypertens Suppl* 1988;6:S461-3.
- Funakoshi Y, Ichiki T, Ito K, Takeshita A. Induction of interleukin-6 expression by angiotensin II in rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1999;34:118-125.
- Funatsu H, Yamashita H, Nakanishi Y, Hori S. Angiotensin II and vascular endothelial growth factor in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 2002;86:311-5.
- Funatsu H, Yamashita H. Pathogenesis of diabetic retinopathy and the renin-angiotensin system. *Ophthalmic & Physiological Optics: The Journal of the British College of Ophthalmic Opticians (Optometrists)* 2003;23:495-501.
- Gallinat S, Yu M, Dorst A, Unger T, Herdegen T. Sciatic nerve transection evokes lasting up-regulation of angiotensin AT2 and AT1 receptor mRNA in adult rat dorsal root ganglia and sciatic nerves. *Brain Res. Mol. Brain Res* 1998;57:111-122.
- de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol. Rev* 2000;52:415-72.
- Ge J, Barnes NM. Alterations in angiotensin AT1 and AT2 receptor subtype levels in brain regions from patients with neurodegenerative disorders. *Eur J Pharmacol* 1996;297:299-306.
- Gilbert RE, Kelly DJ, Cox AJ, et al. Angiotensin converting enzyme inhibition reduces retinal overexpression of vascular endothelial growth factor and hyperpermeability in experimental diabetes. *Diabetologia* 2000;43:1360-7.
- Gilbert RE, Krum H, Wilkinson-Berka J, Kelly DJ. The renin-angiotensin system and the long-term complications of diabetes: pathophysiological and therapeutic considerations. *Diabet. Med* 2003;20:607-21.
- Gillies MC, Su T. High glucose inhibits retinal capillary pericyte contractility in vitro. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 1993;34:3396-401.
- Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996;19:257-67.
- Grady EF, Sechi LA, Griffin CA, Schambelan M, Kalinyak JE. Expression of AT2 receptors in the developing rat fetus. *J Clin Invest* 1991;88:921-33.
- Hammes, Lemmen. Diabetische Retinopathie und Makulopathie *Diabetologie* 2008; 3 Suppl 2: S 147– S150 - Google-Suche. 2008.
- Hammes H. Pericytes and the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Horm. Metab. Res* 2005;37 Suppl 1:39-43.
- Han Y, Runge MS, Brasier AR. Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor-kappa B transcription factors. *Circ. Res* 1999;84:695-703.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996;6:986-94.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of

- DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 1993;11:1026-30.
- Hiramine C. [Definition and morphological features of apoptosis]. *Rinsho Byori* 1997;45:459-69.
- Hirschi KK, D'Amore PA. Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc Res* 1996;32:687-98.
- Horio N, Clermont AC, Abiko A, et al. Angiotensin AT(1) receptor antagonism normalizes retinal blood flow and acetylcholine-induced vasodilatation in normotensive diabetic rats. *Diabetologia* 2004;47:113-23.
- Iwai M, Liu H, Chen R, et al. Possible inhibition of focal cerebral ischemia by angiotensin II type 2 receptor stimulation. *Circulation* 2004;110:843-848.
- Joussen A, Fauser S, Krohne TU, Lemmen K, Lang GE, Kirchhof B. Diabetische Retinopathie. *Der Ophthalmologe* 2003;100:363-370.
- Joussen AM, Poulaki V, Tsujikawa A, et al. Suppression of diabetic retinopathy with angiotensin-1. *Am J Pathol* 2002;160:1683-93.
- Joyce NC, Haire MF, Palade GE. Contractile proteins in pericytes. I. Immunoperoxidase localization of tropomyosin. *J Cell Biol* 1985a;100:1379-86.
- Joyce NC, Haire MF, Palade GE. Contractile proteins in pericytes. II. Immunocytochemical evidence for the presence of two isomyosins in graded concentrations. *J Cell Biol* 1985b;100:1387-95.
- Kane R, Stevenson L, Godson C, Stitt AW, O'Brien C. Gremlin gene expression in bovine retinal pericytes exposed to elevated glucose. *Br J Ophthalmol* 2005;89:1638-42.
- Kanwar M, Chan P, Kern TS, Kowluru RA. Oxidative damage in the retinal mitochondria of diabetic mice: possible protection by superoxide dismutase. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:3805-11.
- Kaschina E, Grzesiak A, Li J, et al. Angiotensin II type 2 receptor stimulation: a novel option of therapeutic interference with the renin-angiotensin system in myocardial infarction? *Circulation* 2008;118:2523-32.
- Khan ZA, Chakrabarti S. Cellular signaling and potential new treatment targets in diabetic retinopathy. *Experimental Diabetes Research* 2007;2007:31867.
- Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev* 2000;52:11-34.
- Klein BE, Moss SE, Klein R. Effect of pregnancy on progression of diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 1990;13:34-40.
- Klein R, Klein BE, Moss SE, Cruickshanks KJ. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. XV. The long-term incidence of macular edema. *Ophthalmology* 1995;102:7-16.
- Klein R, Klein BE, Moss SE, Cruickshanks KJ. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy: XVII. The 14-year incidence and progression of diabetic retinopathy and associated risk factors in type 1 diabetes. *Ophthalmology* 1998;105:1801-15.
- Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. Is blood pressure a predictor of the incidence or progression of diabetic retinopathy? *Arch Intern Med* 1989;149:2427-32.
- Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. II. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis

- is less than 30 years. *Arch Ophthalmol* 1984a;102:520-6.
- Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. III. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is 30 or more years. *Arch Ophthalmol* 1984b;102:527-32.
- Kolm-Litty V, Sauer U, Nerlich A, Lehmann R, Schleicher ED. High glucose-induced transforming growth factor beta1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 1998;101:160-9.
- Kowluru RA, Odenbach S. Role of interleukin-1beta in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 2004;88:1343-7.
- Kowluru RA. Diabetic retinopathy: mitochondrial dysfunction and retinal capillary cell death. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:1581-87.
- Kowluru RA, Chan P. Oxidative stress and diabetic retinopathy. *Experimental Diabetes Research* 2007;2007:43603.
- Kowluru RA, Koppolu P. Diabetes-induced activation of caspase-3 in retina: effect of antioxidant therapy. *Free Radic Res* 2002;36:993-9.
- Kowluru RA, Koppolu P, Chakrabarti S, Chen S. Diabetes-induced activation of nuclear transcriptional factor in the retina, and its inhibition by antioxidants. *Free Radic Res* 2003;37:1169-80.
- Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 1998;47:859-66.
- Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000;6:513-9.
- Laflamme L, Gasparo M, Gallo JM, Payet MD, Gallo-Payet N. Angiotensin II induction of neurite outgrowth by AT2 receptors in NG108-15 cells. Effect counteracted by the AT1 receptors. *J Biol Chem* 1996;271:22729-35.
- Larsen M, Hommel E, Parving HH, Lund-Andersen H. Protective effect of captopril on the blood-retina barrier in normotensive insulin-dependent diabetic patients with nephropathy and background retinopathy. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol* 1990;228:505-509.
- Leri A, Liu Y, Li B, et al. Up-regulation of AT(1) and AT(2) receptors in postinfarcted hypertrophied myocytes and stretch-mediated apoptotic cell death. *Am J Pathol* 2000;156:1663-72.
- Levy BI, Benessiano J, Henrion D, et al. Chronic blockade of AT2-subtype receptors prevents the effect of angiotensin II on the rat vascular structure. *J. Clin. Invest* 1996;98:418-425.
- Li D, Yang B, Philips MI, Mehta JL. Proapoptotic effects of ANG II in human coronary artery endothelial cells: role of AT1 receptor and PKC activation. *Am J Physiol* 1999;276:H786-92.
- Li J, Culman J, Hörtnagl H, et al. Angiotensin AT2 receptor protects against cerebral ischemia-induced neuronal injury. *FASEB J* 2005;19:617-619.
- Li W, Liu X, He Z, Yanoff M, Jian B, Ye X. Expression of apoptosis regulatory genes by retinal pericytes after rapid glucose reduction. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 1998;39:1535-43.
- Lucius R, Gallinat S, Rosenstiel P, Herdegen T, Sievers J, Unger T. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor promotes axonal regeneration in the optic nerve of adult rats. *J. Exp. Med* 1998;188:661-670.

- Makino I, Shibata K, Ohgami Y, Fujiwara M, Furukawa T. Transient upregulation of the AT2 receptor mRNA level after global ischemia in the rat brain. *Neuropeptides* 1996;30:596-601.
- Malone JJ, Morrison AD, Pavan PR, Cuthbertson DD. Prevalence and significance of retinopathy in subjects with type 1 diabetes of less than 5 years' duration screened for the diabetes control and complications trial. *Diabetes Care* 2001;24:522-6.
- Marchesi C, Paradis P, Schiffrin EL. Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. *Trends Pharmacol Sci* 2008;29:367-74.
- Matavelli LC, Huang J, Siragy HM. Angiotensin AT2 Receptor Stimulation Inhibits Early Renal Inflammation in Renovascular Hypertension. *Hypertension* 2011;57:308-313.
- McIntosh LC, Muckersie L, Forrester JV. Retinal capillary endothelial cells prefer different substrates for growth and migration. *Tissue Cell* 1988;20:193-209.
- McMahon G. VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *Oncologist* 2000;5 Suppl 1:3-10.
- Meffert S, Stoll M, Steckelings UM, Bottari SP, Unger T. The angiotensin II AT2 receptor inhibits proliferation and promotes differentiation in PC12W cells. *Mol. Cell. Endocrinol* 1996a;122:59-67.
- Meffert S, Stoll M, Steckelings UM, Bottari SP, Unger T. The angiotensin II AT2 receptor inhibits proliferation and promotes differentiation in PC12W cells. *Mol Cell Endocrinol* 1996b;122:59-67.
- Miller JW, Adamis AP, Aiello LP. Vascular endothelial growth factor in ocular neovascularization and proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Metab Rev* 1997;13:37-50.
- Miwa K, Nakamura J, Hamada Y, et al. The role of polyol pathway in glucose-induced apoptosis of cultured retinal pericytes. *Diabetes Res Clin Pract* 2003;60:1-9.
- Mizutani M, Kern TS, Lorenzi M. Accelerated death of retinal microvascular cells in human and experimental diabetic retinopathy. *J Clin Invest* 1996a;97:2883-90.
- Mizutani M, Kern TS, Lorenzi M. Accelerated death of retinal microvascular cells in human and experimental diabetic retinopathy. *J Clin Invest* 1996b;97:2883-90.
- Mocan MC, Kadayifcilar S, Eldem B. Elevated intravitreal interleukin-6 levels in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Can J Ophthalmol* 2006;41:747-52.
- Moravski CJ, Kelly DJ, Cooper ME, et al. Retinal neovascularization is prevented by blockade of the renin-angiotensin system. *Hypertension* 2000;36:1099-104.
- Motiejūnaite R, Kazlauskas A. Pericytes and ocular diseases. *Exp. Eye Res* 2008;86:171-7.
- Munzenmaier DH, Greene AS. Opposing actions of angiotensin II on microvascular growth and arterial blood pressure. *Hypertension* 1996;27:760-765.
- Nadal JA, Scicli GM, Carhini LA, Scicli AG. Angiotensin II stimulates migration of retinal microvascular pericytes: involvement of TGF-beta and PDGF-BB. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* 2002;282:H739-48.
- Nagai N, Noda K, Urano T, et al. Selective suppression of pathologic, but not physiologic, retinal neovascularization by blocking the angiotensin II type 1 receptor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:1078-84.
- Nagisa Y, Shintani A, Nakagawa S. The angiotensin II receptor antagonist candesartan cilexetil

- (TCV-116) ameliorates retinal disorders in rats. *Diabetologia* 2001;44:883-8.
- Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, et al. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:10663-7.
- Nehmé A, Edelman J. Dexamethasone inhibits high glucose-, TNF-alpha-, and IL-1beta-induced secretion of inflammatory and angiogenic mediators from retinal microvascular pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:2030-8.
- Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000;404:787-90.
- Nouet S, Nahmias C. Signal transduction from the angiotensin II AT2 receptor. *Trends Endocrinol Metab* 2000;11:1-6.
- Orlidge A, D'Amore PA. Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells. *J Cell Biol* 1987;105:1455-62.
- Otani A, Takagi H, Oh H, et al. Angiotensin II-stimulated vascular endothelial growth factor expression in bovine retinal pericytes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 2000;41:1192-9.
- Park SY, Kim EY, Jeon K, et al. Survivin acts as anti-apoptotic factor during the development of bovine pre-implantation embryos. *Mol Reprod Dev* 2007;74:582-90.
- Podestà F, Romeo G, Liu WH, et al. Bax is increased in the retina of diabetic subjects and is associated with pericyte apoptosis in vivo and in vitro. *Am J Pathol* 2000;156:1025-32.
- Pop C, Timmer J, Sperandio S, Salvesen GS. The apoptosome activates caspase-9 by dimerization. *Mol Cell* 2006;22:269-75.
- Qaum T, Xu Q, Jousseaume AM, et al. VEGF-initiated blood-retinal barrier breakdown in early diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:2408-13.
- Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 2000;157:1415-30.
- Reinecke K, Lucius R, Reinecke A, Rickert U, Herdegen T, Unger T. Angiotensin II accelerates functional recovery in the rat sciatic nerve in vivo: role of the AT2 receptor and the transcription factor NF-kappaB. *FASEB J* 2003;17:2094-2096.
- Romeo G, Liu W, Asnaghi V, Kern TS, Lorenzi M. Activation of nuclear factor-kappaB induced by diabetes and high glucose regulates a proapoptotic program in retinal pericytes. *Diabetes* 2002;51:2241-8.
- Rompe F, Artuc M, Hallberg A, et al. Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation acts anti-inflammatory through epoxyeicosatrienoic acid and inhibition of nuclear factor kappaB. *Hypertension* 2010;55:924-931.
- Rosenstiel P, Gallinat S, Arlt A, Unger T, Sievers J, Lucius R. Angiotensin AT2 receptor ligands: do they have potential as future treatments for neurological disease? *CNS Drugs* 2002;16:145-53.
- Sano M, Fukuda K, Kodama H, et al. Interleukin-6 family of cytokines mediate angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in rodent cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2000; 275:29717-23.
- Sarlos S, Rizkalla B, Moravski CJ, Cao Z, Cooper ME, Wilkinson-Berka JL. Retinal angiogenesis is mediated by an interaction between the angiotensin type 2 receptor, VEGF, and angiopoietin. *Am J Pathol* 2003;163:879-87.

- Schreck R, Albermann K, Baeuerle PA. Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic Res Commun* 1992;17:221-37.
- Shenoy UV, Richards EM, Huang XC, Summers C. Angiotensin II type 2 receptor-mediated apoptosis of cultured neurons from newborn rat brain. *Endocrinology* 1999;140:500-9.
- Simorre-Pinatel V, Guerrin M, Chollet P, et al. Vasculotropin-VEGF stimulates retinal capillary endothelial cells through an autocrine pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:3393-400.
- Sims DE. Recent advances in pericyte biology--implications for health and disease. *Can J Cardiol* 1991;7:431-43.
- Sjølie AK, Chaturvedi N. The retinal renin-angiotensin system: implications for therapy in diabetic retinopathy. *Journal of Human Hypertension* 2002;16 Suppl 3:S42-6.
- Sjølie AK, Klein R, Porta M, et al. Effect of candesartan on progression and regression of retinopathy in type 2 diabetes (DIRECT-Protect 2): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2008;372:1385-1393.
- Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem* 2001;276:7320-6.
- Sone H, Kawakami Y, Okuda Y, et al. Ocular vascular endothelial growth factor levels in diabetic rats are elevated before observable retinal proliferative changes. *Diabetologia* 1997;40:726-30.
- Steckelings UM, Kaschina E, Unger T. The AT2 receptor--a matter of love and hate. *Peptides* 2005;26:1401-9.
- Steckelings UM, Stroder K, Reichenbach A, et al. AT2 receptor stimulation and AT1 receptor blockade act anti-apoptotic and tissue-protective in experimental diabetic retinopathy. *Journal of Hypertension* 2009;27:312. Abstract for the 19th European Meeting on Hypertension, Milan, Italy, June 2009
- Stitt AW, Li YM, Gardiner TA, Bucala R, Archer DB, Vlassara H. Advanced glycation end products (AGEs) co-localize with AGE receptors in the retinal vasculature of diabetic and of AGE-infused rats. *Am J Pathol* 1997;150:523-31.
- Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T. The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest* 1995;95:651-7.
- Strain WD, Chaturvedi N. The renin-angiotensin-aldosterone system and the eye in diabetes. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System: JRAAS* 2002;3:243-6.
- Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egido J. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:881-900.
- Tanaka M, Ohnishi J, Ozawa Y, et al. Characterization of Angiotensin II Receptor Type 2 during Differentiation and Apoptosis of Rat Ovarian Cultured Granulosa Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1995;207:593-598.
- Thornalley PJ. The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem J* 1990;269:1-11.
- Tsutsumi Y, Matsubara H, Masaki H, et al. Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation. *J Clin Invest* 1999;104:925-

35.

- UKPDS Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 1998;352:837-53.
- Unger T, Chung O, Csikos T, et al. Angiotensin receptors. *J Hypertens Suppl* 1996;14:S95-103.
- Ushizawa K, Takahashi T, Kaneyama K, Hosoe M, Hashizume K. Cloning of the bovine antiapoptotic regulator, BCL2-related protein A1, and its expression in trophoblastic binucleate cells of bovine placenta. *Biol Reprod* 2006;74:344-51.
- Wagner J, Jan Danser AH, Derkx FH, et al. Demonstration of renin mRNA, angiotensinogen mRNA, and angiotensin converting enzyme mRNA expression in the human eye: evidence for an intraocular renin-angiotensin system. *Br J Ophthalmol* 1996;80:159-63.
- Wells-Knecht KJ, Zyzak DV, Litchfield JE, Thorpe SR, Baynes JW. Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry* 1995;34:3702-9.
- Wilkinson-Berka JL. Angiotensin and diabetic retinopathy. *Int. J. Biochem. Cell Biol* 2006;38:752-65.
- Williams B, Gallacher B, Patel H, Orme C. Glucose-induced protein kinase C activation regulates vascular permeability factor mRNA expression and peptide production by human vascular smooth muscle cells in vitro. *Diabetes* 1997;46:1497-503.
- Wong HC, Boulton M, Marshall J, Clark P. Growth of retinal capillary endothelia using pericyte conditioned medium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 1987;28:1767-75.
- Wright JW, Yamamoto BJ, Harding JW. Angiotensin receptor subtype mediated physiologies and behaviors: new discoveries and clinical targets. *Prog Neurobiol* 2008;84:157-81.
- Wu L, Iwai M, Nakagami H, et al. Roles of angiotensin II type 2 receptor stimulation associated with selective angiotensin II type 1 receptor blockade with valsartan in the improvement of inflammation-induced vascular injury. *Circulation* 2001;104:2716-21.
- Wu L, Iwai M, Nakagami H, et al. Effect of angiotensin II type 1 receptor blockade on cardiac remodeling in angiotensin II type 2 receptor null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:49-54.
- Yamada T, Horiuchi M, Dzau VJ. Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:156-60.
- Yamagishi S, Amano S, Inagaki Y, et al. Advanced Glycation End Products-Induced Apoptosis and Overexpression of Vascular Endothelial Growth Factor in Bovine Retinal Pericytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002;290:973-978.
- Yao Y, Zebboudj AF, Shao E, Perez M, Boström K. Regulation of bone morphogenetic protein-4 by matrix GLA protein in vascular endothelial cells involves activin-like kinase receptor 1. *J Biol Chem* 2006;281:33921-30.
- Yuuki T, Kanda T, Kimura Y, et al. Inflammatory cytokines in vitreous fluid and serum of patients with diabetic vitreoretinopathy. *J Diabetes Complications* 2001;15:257-9.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Potentieller Mechanismus, durch den die Hyperglykämie-induzierte, mitochondriale Überproduktion von Sauerstoffradikalen die vier Wege hyperglykämischer Schädigungen aktiviert.	12
Abb. 2: Pathogenese der diabetischen Retinopathie.....	13
Abb. 3: Das Renin-Angiotensin-System	15
Abb. 4: VEGF – ein bedeutender pathogener Faktor der diabetischen Retinopathie.....	17
Abb. 5: Die Entwicklung von charakteristischen Gefäßveränderungen bei der diabetischen Retinopathie	19
Abb. 6: Belegung der Platten für das Stimulationsexperiment unter normoglykämischen Bedingungen Angiotensin II (Ang II), Candesartan (Cand), Dimethylsulfoxid (DMSO)	29
Abb. 7: Belegung der Platten für das Stimulationsexperiment unter hyperglykämischen Bedingungen Angiotensin II (Ang II), Candesartan (Cand), Compound 21 (C21), PD 123319 (PD), Dimethylsulfoxid (DMSO).....	30
Abb. 8: Typische Morphologie der Perizytenzellkultur	38
Abb. 9: Darstellung von α -Smooth-Muscle-Actin in Perizyten	39
Abb. 10: Fehlende Anfärbbarkeit der Perizyten mit Anti-Von-Willebrand-Faktor Antikörpern in der....	39
Abb. 11: Darstellung vom Von-Willebrand-Faktor in Endothelzellen	39
Abb. 12: Einfluss von Angiotensin II auf die Expression von VEGF in Perizyten.....	41
Abb. 13: Einfluss von Angiotensin II auf die Expression von IL-6 in Perizyten.....	42
Abb. 14: Einfluss von Angiotensin II auf die Expression von Caspase-3 in Perizyten.....	43
Abb. 15: Einfluss von Angiotensin II auf die Expression von Bax in Perizyten.....	43
Abb. 16: Glukosezeitreihe – VEGF mRNA Expression	45
Abb. 17: Glukosezeitreihe – IL-6 mRNA Expression.....	46
Abb. 18: Glukosezeitreihe – Caspase-3 mRNA Expression	47
Abb. 19: Glukosezeitreihe – Bax mRNA Expression	47
Abb. 20: Einfluss von Candesartan auf die Expression von VEGF in Perizyten unter hyperglykämischen Bedingungen.....	49
Abb. 21: Einfluss von Candesartan auf die Expression von IL-6 in Perizyten unter hyperglykämischen Bedingungen.....	50
Abb. 22: Einfluss von Candesartan auf die Expression von Caspase-3 in Perizyten unter hyperglykämischen Bedingungen	51
Abb. 23: Einfluss von Candesartan auf die Expression von Bax in Perizyten unter hyperglykämischen Bedingungen.....	52
Abb. 24: Einfluss von Compound 21 auf die Expression von VEGF in Perizyten unter hyperglykämischen Bedingungen.....	53
Abb. 25: Einfluss von Compound 21 auf die Expression von IL-6 in Perizyten unter hyperglykämischen Bedingungen.....	54

Abb. 26: Einfluss von Compound 21 auf die Expression von Caspase-3 in Perizyten unter hyperglykämischen Bedingungen 55

Abb. 27: Einfluss von Compound 21 auf die Expression von Bax in Perizyten unter hyperglykämischen Bedingungen..... 55

8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Stadieneinteilung, ophthalmologischer Befund und Therapie	9
Tab. 2: Lösungsmittel, Konzentration der Stocklösung und Konzentration der verwendeten Substanzen .	30
Tab. 3: Darstellung der Primersequenzen und Annealingtemperatur der verwendeten Primer	34
Tab. 4: Zusammensetzung des SYBR Green® Housemix als 10 ml Vorratslösung.....	35
Tab. 5: Komponenten des quantitativen <i>Real-time</i> PCR Mastermix mit dem SYBR Green® Housemix .	35
Tab. 6: Komponenten des quantitativen <i>Real-time</i> PCR Mastermix mit dem kommerziellen Power SYBR Green® Mastermix	35
Tab. 7: Temperaturprofil einer quantitativen <i>Real-time</i> PCR mit SYBR Green® Housemix.....	36
Tab. 8: Temperaturprofil einer quantitativen <i>Real-time</i> PCR mit dem kommerziellen Power SYBR® Green Mastermix	36

9 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

10 Danksagung

Frau PD Dr. Ulrike M. Steckelings danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und für die Möglichkeit, diese Arbeit am Center for Cardiovascular Research durchführen zu können. Ganz besonders möchte ich mich bei ihr auch für die engagierte und herzliche Betreuung dieser Arbeit bedanken.

Großer Dank gilt Franziska Rompe für die ausgezeichnete Einarbeitung im Labor sowie ihre Hilfsbereitschaft und Geduld.

Katja Schwengel, Pawel Namsolleck und Anja Wieland danke ich für die gute Zusammenarbeit und ihre stetige Unterstützung.

Bei Katja Ströder möchte ich mich für die gemeinsamen Fahrten ins Berliner Umland bedanken. Dies ermöglichte den Beginn der experimentellen Arbeit.

Weiterer Dank gebührt allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Steckelings für die kollegiale Zusammenarbeit und die Hilfestellung in Detailfragen.

Bedanken möchte ich mich auch bei der studentischen Forschungsförderung der Charité für die finanzielle Unterstützung meiner Promotion.

Vor allem danke ich aber meiner Familie, ohne die all dies nicht möglich geworden wäre.

11 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Marie Horlbeck, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Das therapeutische Potential der pharmakologischen Interferenz mit dem Renin-Angiotensin-System im *in vitro* Modell der diabetischen Retinopathie selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst. “

Berlin, den 15.07.2013

Marie Horlbeck