

Regulation der NAD(P)H-Oxidase und LOX-1 durch vasoaktive Substanzen und laminare  
Schubspannung im kardiovaskulären System



**Dissertation**

Zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau

Nicole Dürrschmidt, geb. Hänel  
geboren am 31. Juli 1974 in Plauen

Gutachter:

1. Prof. Henning Morawietz
2. Prof. Roos
3. Dr. Münzel

Halle (Saale), den 10.01.2003  
verteidigt am 22.05.2003

**urn:nbn:de:gbv:3-000005055**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000005055>]

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Bedeutung von Superoxidanionen bei der Entstehung der Arteriosklerose	1
1.2	Die NAD(P)H-Oxidase als wichtigste Quelle der vaskulären Superoxid- anionen-Bildung	4
1.3	Bedeutung des oxLDL-Rezeptors LOX-1 in der Arteriosklerose	6
1.4	ET-1 und Ang II als pro-arteriosklerotische Stimuli	7
1.5	Anti-arteriosklerotische Wirkung von laminarer Schubspannung	9
1.6	Ziel der Arbeit	10
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>12</b>
2.1	Chemikalien	12
2.2	Probenmaterial	12
2.2.1	Kultur von humanen Endothelzellen in Kulturschalen	12
2.2.2	Kultur von humanen Endothelzellen in Pyrex-Röhrchen	14
2.2.3	Präparation von humanen Granulozyten	14
2.2.4	Gewebeproben des linken Ventrikels	14
2.3	Applikation von Schubspannung auf Endothelzellen	15
2.4	Wasserqualität	17
2.5	RNA-Isolation	17
2.5.1	RNA-Isolation aus humanen Endothelzellen mittels TRI REAGENT™	17
2.5.2	RNA-Isolation aus humanen Gewebeproben mittels Cäsiumchlorid- Ultrazentrifugation	17
2.6	Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen durch Absorptionsmessung	18
2.7	Reverse Transkription	18
2.8	Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion	19
2.9	Standard-kalibrierte kompetitive Polymerase-Kettenreaktion	20
2.9.1	Konstruktion der internen Standards	20
2.9.2	Klonierung der Standardfragmente	22
2.9.3	Plasmidisolation	22
2.9.4	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	23

2.9.5	Polymerase-Kettenreaktion mit internem Standard	23
2.10	Agarose-Gelelektrophorese	25
2.11	Elektroelution von Nukleinsäuren	26
2.12	DNA-Sequenzierung	26
2.13	Protein-Isolation	27
2.13.1	Protein-Isolation aus humanen Endothelzellen	27
2.13.2	Protein-Isolation aus humanem Myokardgewebe	27
2.14	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	27
2.15	Western-Blot	28
2.15.1	Elektrophoretischer Proteintransfer	28
2.15.2	Proteinnachweis	28
2.15.3	Chemilumineszenz-Reaktion mit dem ECL-System	29
2.16	Bestimmung der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität	30
2.16.1	Bestimmung der Superoxidanionen-Bildung durch die Coelenterazin-vermittelte Chemilumineszenz	30
2.16.2	Bestimmung der Superoxidanionen-Bildung durch die Cytochrom c-Nachweismethode	31
2.16.3	Bestimmung der Superoxidanionen-Bildung durch die ESR-Spektroskopie	33
2.17	Bestimmung der oxLDL-Aufnahme	33
2.18	Statistik	34
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>35</b>
3.1	Expression von Nox4 in humanen Endothelzellen	35
3.2	Einfluss von ET-1 auf die Regulation der NAD(P)H-Oxidase und LOX-1	36
3.2.1	Regulation der endothelialen NAD(P)H-Oxidase durch ET-1	36
3.2.2	Regulation des oxLDL-Rezeptors LOX-1 durch ET-1	41
3.3	Einfluss von Ang II auf die Regulation von LOX-1	45
3.4	Einfluss von laminarer Schubspannung auf die Regulation der NAD(P)H-Oxidase und LOX-1	46
3.4.1	Regulation der endothelialen NAD(P)H-Oxidase durch Applikation von laminarer Schubspannung	46
3.4.2	Regulation des oxLDL-Rezeptors LOX-1 durch Applikation von laminarer Schubspannung	58
3.5	Expression von Nox4 im humanen Myokard	60

3.6	Einfluss von ACE-Hemmer-Therapie auf die NAD(P)H-Oxidase im linken Ventrikel von Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz	60
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>66</b>
4.1	Gp91 <sup>phox</sup> -homologe Untereinheiten in humanen Endothelzellen	67
4.2	Induktion der Superoxidanionen-Bildung und oxLDL-Aufnahme durch ET-1 und Ang II in humanen Endothelzellen	68
4.2.1	Induktion der NAD(P)H-Oxidase durch ET-1	68
4.2.2	Induktion von LOX-1 durch ET-1 und Ang II	70
4.2.3	<i>Circulus vitiosus</i> der endothelialen Radikalbildung	72
4.3	Verminderte Superoxidanionen-Bildung und oxLDL-Aufnahme durch arterielle laminare Schubspannung in humanen Endothelzellen	73
4.3.1	Herabregulation der NAD(P)H-Oxidase durch arterielle laminare Schubspannung	73
4.3.2	Herabregulation der oxLDL-Aufnahme durch arterielle laminare Schubspannung	76
4.4	Verminderte Protein-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten durch ACE-Hemmer-Therapie	77
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>79</b>
<b>6</b>	<b>Literatur</b>	<b>82</b>

## **Anhang**

## Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-Konvertierungs- enzym	ICAM-1	interzelluläres Adhäsions- molekül-1
Ang II	Angiotensin II	K	Kontrolle
AT <sub>1</sub>	Angiotensin II-Rezeptor Typ 1	k. A.	keine Angaben
AT <sub>2</sub>	Angiotensin II-Rezeptor Typ 2	LDL	<i>low density</i> -Lipoprotein
BSA	Rinderserum-Albumin	L-NAME	N <sup>G</sup> -Nitro-L-Argenin- methylester
CAT	Katalase	LOX-1	Lektin-ähnlicher oxLDL- Rezeptor-1
cDNA	komplementäre DNA	MAP-Kinase	<i>mitogen activated protein</i> <i>kinase</i>
cGMP	zyklisches Guanosin- monophosphat	mRNA	<i>messenger</i> -RNA
DEPC	Diethylpyrocarbonat	NAD(P)H	Nikotinsäureamidadenin- dinukleotid-(Phosphat)
DEPMPO	5'-Diethoxyphosphoryl-5- methyl-1-pyrrolin-N-oxid	·NO	Stickstoffmonoxid
DETA-NO	2,2'-Hydroxynitrosohydrazino- bis-ethanamin	Nox	NAD(P)H-Oxidase
dH <sub>2</sub> O	deionisiertes Wasser	·O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxidanion
DiI	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'- tetramethylindocarbocyanin- perchlorat	ONOO <sup>-</sup>	Peroxynitrit
DMPO	5,5-Dimethylpyrrolin-N-oxid	oxLDL	oxidiertes <i>low density</i> - Lipoprotein
DNA	Desoxyribonukleinsäure	p	Protein
dNTP	Desoxyribonukleosid- triphosphat	PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
D-PBS	Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
DTT	Dithiotreitol	phox	Phagozyten-Oxidase
ECE	Endothelin-Konvertierungs- enzym	PKC	Proteinkinase C
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	ppET-1	Preproendothelin-1
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'- tetraacetat	RAS	Renin-Angiotensin-System
eNOS	endotheliale ·NO-Synthase	RNA	Ribonukleinsäure
ESR	Elektronen-Spin-Resonanz	ROS	reaktive Sauerstoffspezies
ET-1	Endothelin-1	RT	reverse Transkriptase
ET <sub>A</sub>	Endothelin-Rezeptor Typ A	SAC	<i>stretch-activated cation</i> <i>channels</i>
ET <sub>B</sub>	Endothelin-Rezeptor Typ B	SDS	Natriumdodecylsulfat
FAD	Flavinadenindinukleotid	SOD	Superoxid-Dismutase
gp	Glykoprotein	TE	Tris-EDTA-Puffer
G-Protein	GTP-bindendes Protein	TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
GTP	Guanosintriphosphat	TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung + Tween
HBSS	Hank's gepufferte Salzlösung	Tris	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1- piperazinyl]-ethansulfonsäure	UV	ultra-violett
HIF-1α	Hypoxie-induzierender Faktor- 1α	X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β- D-galaktosid
·HO	Hydroxylradikal		
HUVEC	humane Endothelzellen der Nabelschnurvene		

## 1 Einleitung

Herz-Kreislaufkrankungen sind in den westlichen Industrieländern die Haupttodesursache. Die primäre Ursache für diese Erkrankungen ist häufig die Arteriosklerose, da die Progression der Arteriosklerose das Risiko für Bluthochdruck, koronarer Herzkrankheit und Herzinfarkt erhöht. Die Pathogenese der Arteriosklerose ist verbunden mit einer Akkumulation und oxidativen Modifikation von *low density*-Lipoprotein (LDL) in der Intima, Infiltration von Monozyten bzw. Makrophagen, Schaumzellbildung, Proliferation der glatten Muskelzellen und schließlich Thrombusbildung. Bekannte Risikofaktoren der Arteriosklerose sind Hypertonie, Hyperlipoproteinämie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus und Rauchen. Auch haben Männer ein höheres Arteriosklerose-Risiko als Frauen (Lusis, 2000).

Die molekularen Mechanismen der Entstehung und die Lokalisierung von arteriosklerotischen Plaques in den Gefäßen sind noch nicht vollständig aufgeklärt. In dieser Arbeit wurde die Beteiligung von vaskulär gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) an der Arteriosklerose-Entstehung näher untersucht. Zu den ROS zählen u.a. die Superoxidanionen ( $\cdot\text{O}_2^-$ ),  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Hydroxylradikale ( $\cdot\text{OH}$ ), wobei jedoch die  $\cdot\text{O}_2^-$  innerhalb der ROS eine zentrale Stellung einnehmen.

### 1.1 Bedeutung von Superoxidanionen bei der Entstehung der Arteriosklerose

Die Produktion von ROS beginnt meist mit der Bildung von  $\cdot\text{O}_2^-$ . Oxidasen sind in der Lage ein Elektron auf molekularen Sauerstoff zu übertragen und  $\cdot\text{O}_2^-$  zu produzieren (Freeman & Crapo, 1982; Kehrer, 1993).  $\cdot\text{O}_2^-$  ist ein negativ geladenes Radikal, das mit biologischen Komponenten eine Vielzahl von chemischen Reaktionen eingehen kann. Eine wichtige Interaktion von  $\cdot\text{O}_2^-$  ist die Reaktion mit Stickstoffmonoxid ( $\cdot\text{NO}$ ). Dabei entsteht das zytotoxische Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) (Gryglewski *et al.*, 1986).  $\text{ONOO}^-$  ist ein starkes Oxidationsmittel, das durch Nitrierung von Tyrosin- bzw. Tryptophan-Resten (Ischiropoulos *et al.*, 1992; Alvarez *et al.*, 1996; Padmaja *et al.*, 1996; Grune *et al.*, 1998) oder Oxidation von Methionin- bzw. Selenocystein-Resten (Pryor *et al.*, 1994; Padmaja *et al.*, 1998) die Eigenschaften und die Aktivität von Proteinen beeinträchtigen kann. Es stört dabei zelluläre Signalmechanismen (Callsen *et al.*, 1999; Takakura *et al.*, 1999). Anti-oxidative Enzyme wie die Glutathion-Peroxidase (Padmaja *et al.*, 1998), die Katalase (CAT) (Davidson *et al.*, 1997) und die Superoxid-Dismutase (SOD) (Quijano *et al.*, 2001) werden ebenfalls durch  $\text{ONOO}^-$  gehemmt.

Bei der Entstehung von  $\text{ONOO}^-$  wird  $\cdot\text{NO}$  selbst inaktiviert. Die wichtigste Funktion von  $\cdot\text{NO}$  ist die Regulation des Gefäßtonus. Darüber hinaus bewirkt  $\cdot\text{NO}$  anti-arteriosklerotische Effekte wie die verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen (Khan *et al.*, 1996), die Hemmung der Thrombozyten-Aggregation (Radomski *et al.*, 1987) sowie die Proliferation der glatten Muskelzellen (Garg & Hassid, 1989). Die verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen verhindert die Anheftung von Monozyten bzw. Makrophagen an den Endothelzellen und somit das Einwandern dieser Phagozyten in die Intima.  $\cdot\text{NO}$  wird in den Endothelzellen durch die endotheliale  $\cdot\text{NO}$ -Synthase (eNOS) gebildet. Da  $\cdot\text{NO}$  sofort durch die Membran diffundieren kann, gelangt es aus der synthetisierenden Zelle direkt in benachbarte Zellen. Seine vasodilatierende Wirkung vermittelt  $\cdot\text{NO}$  an den glatten Gefäßmuskelzellen. Dort reagiert  $\cdot\text{NO}$  mit den Eisen-Ionen im aktivem Zentrum des Enzyms Guanylatzyklase, das dadurch zur Synthese von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) angeregt wird. Der Anstieg des cGMP-Spiegels aktiviert GTP-bindende Proteine (G-Proteine), die letztendlich über weitere Proteinkinasen eine Relaxation der Gefäße durch verringerte Freisetzung und verstärkte Wiederaufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  in das sarkoplasmatische Retikulum bewirken (Lincoln *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1997). Zusätzlich aktiviert  $\cdot\text{NO}$  direkt  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige  $\text{K}^+$ -Kanäle in der Membran von glatten Gefäßmuskelzellen (Bolotina *et al.*, 1994). Die Folge ist eine Hyperpolarisation, die zu einer verringerten Erregbarkeit der Zellen führt.

Unter physiologischen Bedingungen besteht ein Gleichgewicht zwischen vaskulär gebildeten ROS und  $\cdot\text{NO}$ . Die Bildung von ROS, speziell die Bildung von  $\cdot\text{O}_2^-$  durch die Oxidasen und der Abbau der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Moleküle durch die SOD wird daher streng kontrolliert. Die wichtigste Funktion der SOD ist der Schutz der  $\cdot\text{NO}$ -Verfügbarkeit und die Verhinderung der  $\text{ONOO}^-$ -Bildung.

Bei pathophysiologisch erhöhter ROS-Bildung entsteht eine endotheliale Dysfunktion, der eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Arteriosklerose zugeschrieben wird (Bossaller *et al.*, 1987; Forstermann *et al.*, 1988; Shimokawa & Vanhoutte, 1989; Sellke *et al.*, 1990). Nicht nur die Inaktivierung von  $\cdot\text{NO}$  durch die Bildung von  $\text{ONOO}^-$ , sondern auch die erhöhte  $\cdot\text{O}_2^-$ -Konzentration selbst lösen pro-arteriosklerotische Effekte aus. So kann eine erhöhte  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung die Expression von Adhäsionsproteinen wie das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) in den Endothelzellen induzieren (Aoki *et al.*, 1997; Chiu *et al.*, 1997; Tummala *et al.*, 2000). Dies fördert die Anheftung von Monozyten bzw. Makrophagen an den Endothelzellen und ermöglicht deren Migration in die Intima. Im

weitem verändert eine erhöhte Generierung an  $\cdot\text{O}_2^-$  (Lagrange *et al.*, 1999) und  $\text{H}_2\text{O}_2$ , das hauptsächlich durch Dismutation aus  $\cdot\text{O}_2^-$  entsteht, die Kontraktilität der Endothelzellen.  $\text{H}_2\text{O}_2$  bewirkt eine verstärkte Phosphorylierung von Myosin durch die Aktivierung der Myosin-Kinase (MLCK) (Zhao & Davis, 1998). Garcia *et al.* konnte zeigen, dass diese Myosin-Phosphorylierung zur Kontraktion von Endothelzellen führt (Garcia *et al.*, 1995). Die Kontraktion bewirkt eine Formveränderung der Endothelzellen (Liu & Sundqvist, 1995), die zu einer Störung der Zell-Zell-Kontakte (Yin *et al.*, 1981) und dadurch zu einer erhöhten Permeabilität führt. Zwischen den Endothelzellen können dann vermehrt Monozyten bzw. Makrophagen in die Intima einwandern (Wood *et al.*, 2000).  $\cdot\text{O}_2^-$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  beeinflussen ebenfalls das Zellwachstum von vaskulären Zellen. Sie dienen dabei als interzelluläre Signalmoleküle, die die Proliferation über Mechanismen, die auch Wachstumsfaktoren nutzen, stimulieren (Clement & Pervaiz, 1999).

Ein für die Entstehung und Progression der Arteriosklerose wichtiges Zielmolekül von  $\cdot\text{O}_2^-$  ist das LDL. Bei erhöhten LDL-Konzentrationen im Blut, z.B. durch Hypercholesterinämie, wird das LDL in der Intima akkumuliert. Die  $\cdot\text{O}_2^-$ -Radikale können den Lipidanteil der in der Intima akkumulierten LDL-Partikel oxidieren (Steinbrecher *et al.*, 1984). Das dabei entstehende oxidativ modifizierte LDL (oxLDL) beeinträchtigt über spezifische Signalmechanismen die endothelial vermittelte Gefäßrelaxation durch eine verminderte Expression der eNOS (Laufs *et al.*, 1998) und induziert die ROS-Bildung (Lehr *et al.*, 1992). Das oxLDL stimuliert in Endothelzellen die Produktion von pro-inflammatorischen Mediatoren wie Adhäsionsmoleküle (Kume *et al.*, 1992) und chemotaktische Faktoren (Cushing *et al.*, 1990). Außerdem fördert oxLDL die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen und deren Expression von Scavenger-Rezeptoren (Rajavashisth *et al.*, 1990; Yoshida *et al.*, 1998b). Das oxLDL wird über diese Rezeptoren von den eingewanderten Makrophagen aufgenommen, die dadurch zu Schaumzellen werden (Witztum & Steinberg, 1991). Durch Stimulation der Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen ist das oxLDL auch bei der Verringerung des Gefäßdurchmessers bei fortschreitender Arteriosklerose beteiligt (Auge *et al.*, 1996; Chai *et al.*, 1996; Chatterjee & Ghosh, 1996). Pro-koagulative Effekte werden ebenfalls durch oxLDL vermittelt, wie die Induktion des Gewebefaktors und des Plasminogenaktivator-Inhibitors II (Drake *et al.*, 1991; Wada *et al.*, 1994). Das oxLDL fördert außerdem die Aggregation von Thrombozyten (Ardlie *et al.*, 1989).

Eine erhöhte Bildung von  $\cdot\text{O}_2^-$  kann somit in vielfältiger Weise an der Entstehung und Progression der Arteriosklerose beteiligt sein. Sowohl die durch  $\cdot\text{O}_2^-$  vermittelte Inaktivierung

von  $\cdot\text{NO}$  und die Generierung des oxLDL, als auch  $\cdot\text{O}_2^-$  selbst können zur Entstehung des Krankheitsbildes beitragen.

## 1.2 Die NAD(P)H-Oxidase als wichtigste Quelle der vaskulären Superoxidanionen-Bildung

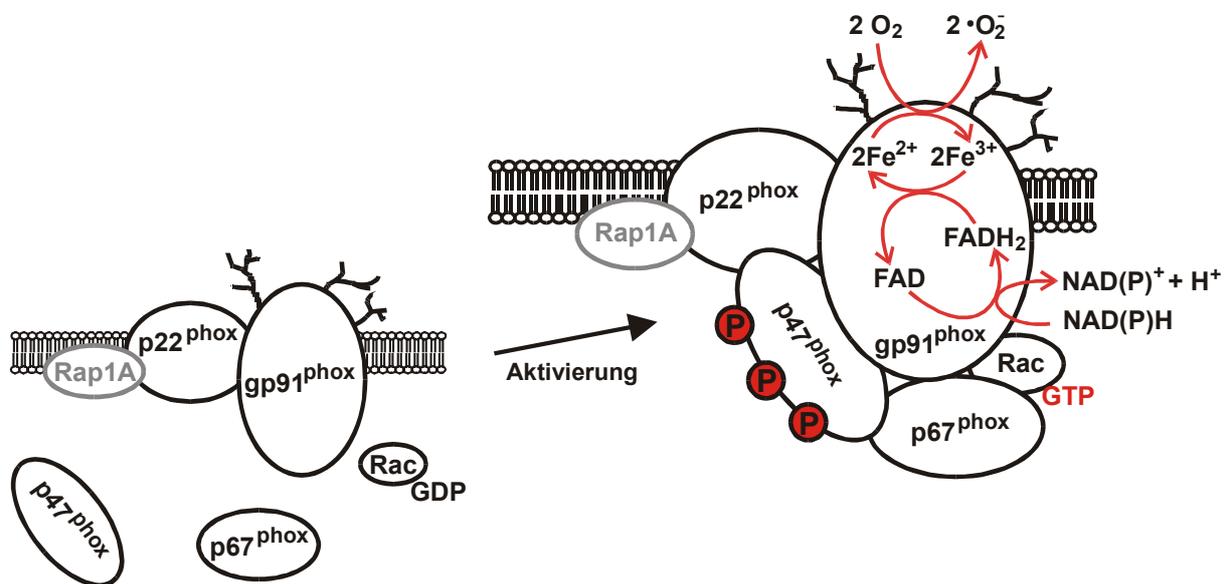
Ursprünglich wurde die NADPH-Oxidase in den Zellmembranen von phagozytierenden Zellen identifiziert. Nach Phagozytose produziert dieses Enzym große Mengen an  $\cdot\text{O}_2^-$ , die an der Abtötung der aufgenommenen Mikroorganismen beteiligt sind (Reeves *et al.*, 2002). Enzym-Defekte führen zum Krankheitsbild der chronischen Granulomatose (CGD). Diese Patienten sind aufgrund der gestörten Immunabwehr besonders anfällig gegenüber Infektionen (Smith & Curnutte, 1991).

NAD(P)H-Oxidasen konnten später auch in vaskulären Zellen wie Endothelzellen (Zulueta *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1996), glatten Gefäßmuskelzellen (Griendling *et al.*, 1994) und Fibroblasten (Meier *et al.*, 1991; Jones *et al.*, 1994) nachgewiesen werden. Diese NAD(P)H-Oxidasen produzieren im Vergleich zu der NADPH-Oxidase in den Phagozyten im unstimulierten Zustand konstitutiv  $\cdot\text{O}_2^-$  in niedrigen Konzentrationen (Mohazzab *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2001b). Die NADPH-Oxidase in den Phagozyten verwenden reduziertes Nikotinsäureamidadeninucleotid-Phosphat (NADPH) als Elektronendonator (Curnutte *et al.*, 1987). Dagegen ist die vaskuläre ROS-Bildung mit reduziertem Nikotinsäureamidadeninucleotid (NADH) stärker stimulierbar (Griendling *et al.*, 1994; Mohazzab *et al.*, 1994; Sorescu *et al.*, 2002). Die vaskuläre NAD(P)H-Oxidase scheint somit nicht völlig identisch mit dem Enzym in den Phagozyten zu sein.

Andere  $\cdot\text{O}_2^-$ -produzierende Enzyme wie die Xanthin-Oxidase, die Lipoxygenase, die Cyclooxygenase, die P450 Monooxygenase, die  $\cdot\text{NO}$ -Synthase und die Oxidasen der Atmungskette konnten ebenfalls in den Zellen nachgewiesen werden (Wolf, 2000). Mohazzab *et al.* konnte jedoch zeigen, dass die NAD(P)H-Oxidase in den Endothelzellen die Hauptquelle der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung darstellt (Mohazzab *et al.*, 1994).

Die endotheliale NAD(P)H-Oxidase besitzt den gleichen strukturellen Aufbau wie die NADPH-Oxidase in den Phagozyten. Der für die  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung notwendige Enzymkomplex besteht aus vier Untereinheiten, die im äquimolaren Verhältnis binden (Uhlinger *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1995; Wallach & Segal, 1996). Die membranständigen Untereinheiten gp91<sup>phox</sup> und p22<sup>phox</sup>, die das Cytochrom b<sub>558</sub> bilden (Royer-Pokora *et al.*, 1986; Dinauer *et al.*, 1987; Teahan *et al.*, 1987), mit den beiden zytosolischen Untereinheiten p47<sup>phox</sup> und p67<sup>phox</sup> (Nunoi

*et al.*, 1988; Volpp *et al.*, 1988; Clark *et al.*, 1989) sowie dem G-Protein Rac assoziieren zum aktiven Enzymkomplex. Ein zweites G-Protein Rap1A soll an der Deaktivierung der NAD(P)H-Oxidase beteiligt sein (Leusen *et al.*, 1996). Später wurde mit p40<sup>phox</sup> noch eine weitere zytosolische Untereinheit identifiziert, die jedoch nicht essentiell für die Enzymaktivität ist und deren Funktion noch nicht eindeutig geklärt werden konnte. Zum einen soll es bei Bindung an dem NAD(P)H-Oxidase-Komplex die  $\cdot\text{O}_2^-$ -Generierung hemmen (Sathyamoorthy *et al.*, 1997), zum anderen soll es bei der Assemblierung der NAD(P)H-Oxidase durch eine erhöhte Affinität von p47<sup>phox</sup> zu den anderen Untereinheiten mitwirken (Cross, 2000).



**Abb. 1.1:** Schematische Darstellung des NAD(P)H-Oxidase-Komplexes. Bei Aktivierung wird p47<sup>phox</sup> durch die PKC phosphoryliert. Die zytosolischen NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten bilden mit dem Cytochrom b<sub>558</sub> (p22<sup>phox</sup> und gp91<sup>phox</sup>) und Rac-GTP den aktiven Enzymkomplex, der durch Übertragung eines Elektrons O<sub>2</sub> zu  $\cdot\text{O}_2^-$  reduziert.

Bei der Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase wird die Untereinheit p47<sup>phox</sup> an drei Serin-Resten (Ser-303, Ser-304 und Ser-328) durch die Proteinkinase C (PKC) phosphoryliert (el Benna *et al.*, 1994; Ago *et al.*, 1999). Die Phosphorylierung bewirkt eine Konformationsänderung dieser Untereinheit und legt Bindestellen für die anderen NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten frei. Bei einer Aktivierung erfolgt zusätzlich der Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) zu Guanosintriphosphat (GTP) am Rac-Protein. Dies trägt ebenfalls zur Komplexbildung und zur Regulation der Aktivität bei. Die Untereinheit p67<sup>phox</sup> ist für die Regulation des Elektronentransfers von NAD(P)H auf oxidiertes Flavinadenindinukleotid (FAD)

verantwortlich. Eine Aktivierungsdomäne in p67<sup>phox</sup> ist in der Lage, den Elektronenfluss im Cytochrom b<sub>558</sub> zu aktivieren (Han *et al.*, 1998a; Nisimoto *et al.*, 1999; Babior *et al.*, 2002). Die Cytochrom b<sub>558</sub>-bildenden NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten p22<sup>phox</sup> und gp91<sup>phox</sup> sollten ursprünglich beide am Transfer der Elektronen von NAD(P)H auf O<sub>2</sub> beteiligt sein (Umeki, 1994). Yu *et al.* konnte jedoch zeigen, dass nur gp91<sup>phox</sup> in der Lage ist, Häm (gebundenes Eisen) zu binden und die Elektronen vom NAD(P)H auf O<sub>2</sub> zu übertragen. Es wird daher vermutet, dass p22<sup>phox</sup> ähnlich wie p67<sup>phox</sup> an der Regulation des Elektronentransfers beteiligt ist und Einfluss auf die FAD- bzw. NAD(P)H-Bindung in gp91<sup>phox</sup> hat (Yu *et al.*, 1998) (siehe Abb. 1.1).

In den letzten Jahren konnten in verschiedenen humanen Körperzellen gp91<sup>phox</sup>-Homologe identifiziert werden. Aufgrund von unterschiedlichen Bezeichnungen wurde eine einheitliche Nomenklatur eingeführt. So wird gp91<sup>phox</sup> nun auch als Nox2 (NAD(P)H-Oxidase2) und seine Homologe als Nox1 (Suh *et al.*, 1999; Banfi *et al.*, 2000), Nox3 (Kikuchi *et al.*, 2000), Nox4 (Geiszt *et al.*, 2000; Shiose *et al.*, 2001; Sorescu *et al.*, 2002) und Nox5 (Banfi *et al.*, 2001) bezeichnet. Darüber hinaus konnten NAD(P)H-Oxidasen mit einer zusätzlichen Peroxidase-Domäne identifiziert werden. Diese wurden als Duox1 und 2 (duale Oxidase) bezeichnet (Dupuy *et al.*, 1999; De Deken *et al.*, 2000).

In den vaskulären Zellen konnte neben gp91<sup>phox</sup> auch Nox1 und Nox4 nachgewiesen werden. So konnte in glatten Gefäßmuskelzellen Nox1 und Nox4, aber nur geringe Mengen von gp91<sup>phox</sup> identifiziert werden. Dagegen wurden in den Endothelzellen bzw. Fibroblasten gp91<sup>phox</sup> und kürzlich Nox4, aber nur auf sehr niedrigem Niveau Nox1 nachgewiesen. Die Funktionen der verschiedenen katalytischen Untereinheiten an der vaskulären ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Bildung ist jedoch noch nicht verstanden (Sorescu *et al.*, 2002).

### 1.3 Bedeutung des oxLDL-Rezeptors LOX-1 in der Arteriosklerose

Die oxidative Modifikation von LDL zu oxLDL ist ein wichtiger Schritt in der Pathogenese der Arteriosklerose. Das oxLDL wird durch Scavenger-Rezeptoren von Monozyten bzw. Makrophagen aufgenommen und vermittelt dort, wie oben bereits beschrieben, pro-arteriosklerotische Effekte in der Gefäßwand (Freeman, 1997; Steinbrecher, 1999). In den Endothelzellen konnten keine klassischen Scavenger-Rezeptoren nachgewiesen werden (Bickel & Freeman, 1992). Sawamura *et al.* konnte jedoch in Endothelzellen einen Lektin-ähnlichen oxLDL-Rezeptor (LOX-1) identifizieren (Sawamura *et al.*, 1997). Der LOX-1-Rezeptor wird auf sehr niedrigem Niveau auch in Makrophagen (Yoshida *et al.*, 1998a),

Thrombozyten (Chen *et al.*, 2001) und glatten Gefäßmuskelzellen (Kataoka *et al.*, 2001) exprimiert.

LOX-1 ist für die Bindung, Aufnahme mit nachfolgendem proteolytischen Abbau von oxLDL verantwortlich. Die Bindung von oxLDL am Rezeptor vermittelt endotheliale Dysfunktion durch Induktion von intrazellulärer ROS-Bildung und Aktivierung von Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren (Kusuhara *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997; Han *et al.*, 1998b; Cominacini *et al.*, 2001). So stimuliert oxLDL u.a. die *mitogen activated protein kinase* (MAP-Kinase). Diese aktiviert im weiteren den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B, der die Expression von spezifischen Genen reguliert (Li & Mehta, 2000). So wird z.B. die Expression von Adhäsionsmolekülen (Kume *et al.*, 1992) und chemotaktischen Faktoren (Cushing *et al.*, 1990) induziert.

Während der Arteriosklerose-Entstehung kommt es zu einer Induktion der LOX-1-Expression. In frühen arteriosklerotischen Läsionen humaner Arterien wird LOX-1 in den Endothelzellen verstärkt exprimiert (Kataoka *et al.*, 1999). Die nach Aufnahme von oxLDL induzierte ROS-Bildung bewirkt die Invasion inflammatorischer Zellen. Außerdem inaktiviert die Expression von LOX-1 den Proteinkinase B-Signalweg, der beispielsweise die Expression der eNOS stimuliert (Tang *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001a). Eine Inaktivierung der Proteinkinase B verringert somit die eNOS-Expression. In fortgeschrittenen arteriosklerotischen Plaques konnte eine LOX-1-Expression vorrangig in den in die Intima eingewanderten Makrophagen bzw. glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesen werden. In diesem späten Stadium der Arteriosklerose scheint LOX-1 an der Transformation der Makrophagen zu Schaumzellen (Kataoka *et al.*, 1999) bzw. an der Induktion von Apoptose in den glatten Gefäßmuskelzellen (Bjorkerud & Bjorkerud, 1996) beteiligt zu sein.

In hyperlipidämischen Ratten konnte ebenfalls eine erhöhte endotheliale LOX-1-Expression in arteriosklerotischen Läsionen nachgewiesen werden (Chen *et al.*, 2000). Die Expression von LOX-1 ist auch in hypertensiven Ratten induziert (Nagase *et al.*, 1997). Dies deutet auf eine LOX-1-vermittelte Verbindung von Bluthochdruck und Arteriosklerose hin (Kita, 1999).

#### **1.4 ET-1 und Ang II als pro-arteriosklerotische Stimuli**

Sowohl Endothelin-1 (ET-1) als auch Angiotensin II (Ang II) können bei der Entstehung und Progression der Arteriosklerose beteiligt sein.

ET-1, ein aus 21 Aminosäuren bestehendes Peptid, gilt als stärkster bisher bekannter Vasokonstriktor und wird vorwiegend in vaskulären Endothelzellen, aber auch u.a. in glatten

Gefäßmuskelzellen und Makrophagen gebildet (Yanagisawa *et al.*, 1988). Das von den Endothelzellen gebildete ET-1 wird hauptsächlich in Richtung der glatten Gefäßmuskelzellen sezerniert (Wagner *et al.*, 1992). Seine biologische Wirkung erfolgt durch die Aktivierung von spezifischen Rezeptoren [Endothelin-Rezeptor Typ A (ET<sub>A</sub>) und Typ B (ET<sub>B</sub>)]. Die Aktivierung des ET<sub>A</sub>-Rezeptors führt zur Kontraktion, Proliferation und Migration der glatten Gefäßmuskelzellen (Alberts *et al.*, 1994). In Endothelzellen konnte nur der ET<sub>B</sub>-Rezeptor nachgewiesen werden (Ogawa *et al.*, 1991; Heinroth-Hoffmann *et al.*, 1998). Die Bindung von ET-1 an den ET<sub>B</sub>-Rezeptor bewirkt die Freisetzung von endothelabhängigen Vasodilatoren wie ·NO und Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>) (de Nucci *et al.*, 1988). Die Injektion von ET-1 führt initial zu einer ET<sub>B</sub>-vermittelten Vasodilatation, anschließend jedoch zu einer langanhaltenden ET<sub>A</sub>-vermittelten Vasokonstriktion und Erhöhung des Blutdruckes (Yanagisawa *et al.*, 1988).

Das Oktapeptid Ang II ist ebenfalls ein potenter Vasokonstriktor. Ang II wirkt über den Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 (AT<sub>1</sub>) und Typ 2 (AT<sub>2</sub>) (de Gasparo *et al.*, 2000). Der AT<sub>1</sub>-Rezeptor dominiert in den meisten vaskulären Geweben und ist vorrangig für den Bluthochdruck, die proliferativen Effekte und die Aldosteronsekretion verantwortlich. Der AT<sub>2</sub>-Rezeptor dagegen wird im fetalen Gewebe exprimiert (Nahmias & Strosberg, 1995). Dort soll er eine Rolle in der Entwicklung, bei Wachstumsvorgängen und bei neuronalen Funktionen haben. In der Kreislaufregulation wird der AT<sub>2</sub>-Rezeptor als Gegenspieler des AT<sub>1</sub>-Rezeptors diskutiert (Unger, 1999). Bei der Bildung von Ang II ist das Angiotensin-Konvertierungsenzym (ACE) essentiell. Die pharmakologische Hemmung der Ang II-Bildung durch ACE-Hemmer sowie die Blockade der Ang II-Wirkung durch AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten sind heute Standardtherapien in der Behandlung von Patienten mit Hypertonie und Herzinsuffizienz.

Ein erhöhter Blutdruck ist mit einer Gefäßverengung als Folge einer induzierten Freisetzung von Vasokonstriktoren bzw. einer reduzierten Bildung von Vasodilatoren verbunden (Lüscher & Vanhoutte, 1990). Die Expression von ET-1 und Ang II kann durch mechanische Faktoren bzw. durch lokale und zirkulierende Mediatoren induziert werden (Campbell & Habener, 1986; Yanagisawa *et al.*, 1988; Boulanger & Luscher, 1990; Lindpaintner *et al.*, 1990; Emori *et al.*, 1991; Tamura *et al.*, 1998; Niebauer *et al.*, 2001). Auch wird die Bildung und Freisetzung von ET-1 durch Ang II erhöht (Emori *et al.*, 1991). Ang II induziert die vaskuläre Produktion von ET-1 in Arterien von spontan hypertensiven Ratten (Dohi *et al.*, 1992). Somit werden durch Ang II induzierte hypertensive Effekte durch ET-1 potenziert (Moreau *et al.*, 1997). Bei Ang II-Infusion senkt eine ET<sub>A</sub>-Rezeptor-Blockade nur teilweise den arteriellen

Blutdruck. Die ET<sub>A</sub>-Rezeptor-Blockade schützt dagegen vollständig vor der Ang II-induzierten vaskulären Hypertrophie (d'Uscio *et al.*, 2000).

Zusätzlich induziert das pro-arteriosklerotische oxLDL die Expression von Preproendothelin-1 (ppET-1) und die Freisetzung von endothelialelem ET-1 (Boulanger *et al.*, 1992). In Tiermodellen reduziert die Blockade des ET<sub>A</sub>-Rezeptors die Ausbildung von arteriosklerotischen Plaques in Arterien nach cholesterinreicher Diät (Kowala *et al.*, 1995; Barton *et al.*, 1998).

Diese Befunde unterstützen das pro-arteriosklerotische Potential von ET-1 und Ang II. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch nur unvollständig verstanden.

### 1.5 Anti-arteriosklerotische Wirkung von laminarer Schubspannung

Eine wichtige an der Gefäßwand wirkende biomechanische Kraft ist die Schubspannung. Laminare und turbulente Schubspannung können die Endothelfunktion differenziell beeinflussen. Turbulente Schubspannung tritt häufig an Verzweigungen arterieller Gefäße auf. Dort konnten auch Prädilektionsstellen für die Entstehung von arteriosklerotischen Plaques nachgewiesen werden. Laminare Schubspannung von 10 - 30 dyn/cm<sup>2</sup> wirkt vorrangig auf die Endothelzellen in arteriellen Gefäßen (Traub & Berk, 1998). Niedrigere laminare Schubspannung ist dagegen vorrangig in venösen Gefäßen anzutreffen. Eine Schubspannung von 50 dyn/cm<sup>2</sup> (bis zu 150 dyn/cm<sup>2</sup>) kann dagegen in der Aorta auftreten.

Laminare Schubspannung vermittelt anti-arteriosklerotische Mechanismen. So induziert laminare Schubspannung die Freisetzung von ·NO (Rubanyi *et al.*, 1986; Busse *et al.*, 1989). Zusätzlich stimuliert laminare Schubspannung die Expression des Plasminogenaktivators (Diamond *et al.*, 1990; Kawai *et al.*, 1997) und inhibiert die Sekretion des Plasminogenaktivator-Inhibitors I (Kawai *et al.*, 1997). Langfristige Applikation laminarer Schubspannung reduziert die Adhäsion und Migration von Monozyten bzw. Makrophagen durch verminderte Expression des Monozyten-chemoattraktiven Proteins-1 (MCP-1) und des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 (Traub & Berk, 1998).

Die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen wird ebenfalls durch Applikation von laminarer Schubspannung auf die korrespondierenden Endothelzellen reduziert. So wird die Expression und Freisetzung des wachstumsstimulierenden ET-1 durch laminare Schubspannung inhibiert (Sharefkin *et al.*, 1991; Malek & Izumo, 1992; Morawietz *et al.*, 2000). Die Isoformen des Endothelin-Konvertierungsenzyms (ECE1a und b), die für die Bildung von ET-1 essentiell sind, werden durch arterielle laminare Schubspannung

vermindert exprimiert (Morawietz *et al.*, 2000). Ang II ist ebenfalls ein Wachstumsfaktor glatter Gefäßmuskelzellen (Berk *et al.*, 1996). Die Expression und die Aktivität von ACE, das durch proteolytische Spaltung von Ang I die Bildung von Ang II vermittelt, wird durch laminare Schubspannung gehemmt (Rieder *et al.*, 1997). Die erhöhte Freisetzung von  $\cdot\text{NO}$  durch laminare Schubspannung hemmt zusätzlich die Proliferation glatter Muskelzellen (Buga *et al.*, 1991).

Die Aufnahme von LDL in die Intima kann durch Schubspannung reguliert werden. So konnte gezeigt werden, dass niedrige laminare Schubspannung die LDL-Konzentration an der Oberfläche von Arterien erhöht und damit dessen Infiltration in die Gefäßwand begünstigt (Deng *et al.*, 1995a; Deng *et al.*, 1995b). Auch turbulente bzw. oszillatorische Schubspannung erhöht die Permeabilität der Gefäßwand für LDL. Eine zunehmende LDL-Akkumulation könnte daher in Gefäßbereichen mit nicht-laminarer Schubspannung die Folge sein (Traub & Berk, 1998). Erste molekulare Untersuchungen zur Expression des oxLDL-Rezeptors in Endothelzellen von Rinderaorten unterstützten diese Befunde. Laminare Schubspannung von  $15 \text{ dyn/cm}^2$  induziert die mRNA- und Protein-Expression von LOX-1 nach 4 h, jedoch verringerte sich diese nach längerer Applikationen von Schubspannung (Murase *et al.*, 1998).

## 1.6 Ziel der Arbeit

Das Ziel der Arbeit war die Untersuchung potentieller Mechanismen der Ausbildung und Lokalisation von arteriosklerotischen Plaques. Dadurch sollen molekulare Mechanismen der Arteriosklerose-Entstehung besser verstanden werden.

Da ET-1 als pro-arteriosklerotischer Risikofaktor diskutiert wird, sollte der Einfluss von ET-1 auf die Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten und die  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung überprüft werden. Darüber hinaus wurde untersucht, ob die potentiell pro-arteriosklerotisch wirkenden Substanzen ET-1 und Ang II die Expression des LOX-1-Rezeptors und die oxLDL-Aufnahme in Endothelzellen stimulieren können.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten und die Bildung von  $\cdot\text{O}_2^-$  nach Applikation laminarer Schubspannung in humanen Endothelzellen untersucht. Zusätzlich wurde die LOX-1-Expression und die Aufnahme von oxLDL nach Applikation chronischer hoher laminarer Schubspannung analysiert.

Eine Standardtherapie zur Behandlung von Bluthochdruck und Herzinsuffizienz ist die Verabreichung von ACE-Hemmern. Im dritten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss einer pharmakologischen Hemmung der ACE-Aktivität auf die Genexpression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten im linken Ventrikel von Patienten mit Herzinsuffizienz untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Die Chemikalien wurden mit Ausnahme der spezifisch genannten von den Firmen Sigma (Deisenhofen) bzw. Roth (Karlsruhe) verwendet. Die Zellkulturprodukte und Reagenzien für die reverse Transkriptase (RT) und Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

### 2.2 Probenmaterial

#### 2.2.1 Kultur von humanen Endothelzellen in Kulturschalen

##### Zellkulturprodukte:

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS):	0,14 M NaCl, 0,01 M Phosphatpuffer, 0,0003 M KCl; 1 Tablette wurde in 500 ml deionisiertem Wasser (dH <sub>2</sub> O) gelöst; pH 7,45
100 x Antibiotika/Antimykotika-Lösung:	10.000 U Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin und 25 µg/ml Amphotericin B in 0,85% (w/v) Kochsalzlösung
1 x Hanks' gepufferte Salzlösung (HBSS):	HBSS ohne Kalzium, Magnesium und Phenolrot
1 x Dulbecco's PBS (D-PBS):	D-PBS ohne Kalzium, Magnesium und Natriumbicarbonat
1 x Medium 199:	Medium 199 mit modifizierten Earle's Salzen, L-Glutamin, 1,25 g/l Natriumbicarbonat und Phenolrot
<i>newborn calf</i> -Serum (Biochrom KG, Berlin):	hitzeinaktiviert
Fungizone <sup>®</sup> :	250 µg/ml Amphotericin B
<i>endothelial cell growth supplement</i> (Wachstumsfaktor; c.c.pro, Neustadt)	

##### Hergestellte Lösungen, Puffer und Medien:

Gelatine Type B:	1% (w/v) Gelatine Type B in dH <sub>2</sub> O
------------------	---

Nabelschnurpuffer:	PBS 1 x Antibiotika/Antimykotika
Collagenase IV-Lösung:	7 mg Collagenase IV in 15 ml D-PBS
Endothelzellmedium:	Medium 199 0,5% bzw. 10% (v/v) <i>newborn calf</i> -Serum 15 mM 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure (Hepes) 1 x Antibiotika/Antimykotika 1:100 Fungizone® 1:100 <i>endothelial cell growth supplement</i> mit 1 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt

#### Durchführung:

Die Isolation der Endothelzellen aus der humanen Nabelschnurvene (HUVEC) erfolgte nach der Methode von Jaffe *et al.* (1973).

Nach der Entbindung wurden die Nabelschnüre in Nabelschnurpuffer überführt und bei 4°C bis zu 24 h gelagert. Für die Präparation der Endothelzellen wurden Knopfkanülen mit Schlauchansätze von beiden Seiten der Nabelschnur eingeführt und diese mit einem Polyester-S-Faden (Catgut GmbH, Markneukirchen) befestigt. Anschließend wurde die Nabelschnurvene mit 30 ml 1 x HBSS gespült. Danach wurde die Vene mit 15 ml Collagenase IV-Lösung gefüllt und die Schlauchansätze mit Klemmen verschlossen. In einem mit PBS gefüllten Becherglas wurde die Nabelschnur für 12 min bei 37°C inkubiert. Die Collagenase löst die Endothelzellen durch den Abbau der extrazellulären Matrix von der Veneninnenwand ab. Die abgelösten Endothelzellen wurden anschließend mit 5 ml Endothelzellmedium (10% (v/v) Serum, ohne Wachstumsfaktor) aus der Vene in ein Röhrchen gespült und bei 250 x g für 6 min sedimentiert. Das Zellpellet wurde in Endothelzellmedium (10% (v/v) Serum, ohne Wachstumsfaktor) resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels Zählkammer bestimmt. In mit 1%iger (w/v) Gelatine vorbehandelten 6 cm-Kulturschalen (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz; 1 h bei 37°C) wurden 1.600.000 – 1.800.000 Endothelzellen überführt und 90 min im Brutschrank (Nunc, Wiesenbaden) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurde das Medium durch 4 ml Endothelzellmedium mit 10% (v/v) Serum ersetzt. Nicht angeheftete Zellen wurden bei diesem Mediumwechsel entfernt. Die weitere Kultivierung erfolgte im Brutschrank. Alle 48 h wurde das Medium gewechselt. Die Endothelzellen waren nach 5 - 7 d konfluent.

Für die Stimulation mit ET-1 und Ang II wurden die Zellen zunächst 3 h in Endothelzellmedium mit 0,5% (v/v) Serum inkubiert und anschließend durch Zugabe von ET-1 bzw. Ang II stimuliert.

### **2.2.2 Kultur von humanen Endothelzellen in Pyrex-Röhrchen**

Die humanen Endothelzellen wurden analog 2.2.1 aus den Nabelschnüren isoliert. Ein mit 1%iger (w/v) Gelatine vorbehandeltes 12 x 75 mm-Pyrex-Röhrchen (Dunn, Asbach) wurde 1 h bei 37°C gelagert. Danach wurden 1.600.000 - 1.800.000 Endothelzellen überführt und 90 min schräg im Brutschrank (Nunc, Wiesenbaden) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Das Röhrchen wurde sechsmal nach jeweils 15 min um 60° gedreht, so dass sich die Endothelzellen auf der gesamten Innenwand des Röhrchen anheften konnten. Danach wurde das Medium durch Endothelzellmedium mit 10% (v/v) Serum ersetzt. Die weitere Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank.

### **2.2.3 Präparation von humanen Granulozyten**

Die humanen Granulozyten wurden aus heparinisiertem Vollblut durch Modifikation der Methode von Biggers & McFeely (1963) präpariert.

Die Ficoll-Trennlösung (Dichte 1,09 mg/cm<sup>3</sup>; Biochrom KG, Berlin) wurde mit PBS (siehe 2.2.1) auf eine Dichte von 1,085 mg/cm<sup>3</sup> eingestellt. Das Vollblut wurde mit PBS 1:2 verdünnt. In einem Zentrifugenröhrchen wurden 3 ml der Ficoll-Trennlösung mit 4 - 5 ml verdünntem Blut überschichtet. Die Probe wurde bei 1.800 x g für 20 min zentrifugiert. Dabei sedimentieren die Erythrozyten. Die Granulozyten reichern sich in der Mitte des Röhrchens an und erscheinen als weißer Ring. Dieser wurden mit einer Pasteur-Pipette entnommen und 1:2 mit PBS verdünnt. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 1.000 x g für 20 min, in der die Granulozyten sedimentieren. Das Pellet wurde anschließend in Lyse-Puffer (50 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan(Tris)-HCl, pH 7,0; 1% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS), 1:25 Proteinase-Inhibitor-Mix) resuspendiert.

### **2.2.4 Gewebeproben des linken Ventrikels**

Die Untersuchung der humanen Gewebeproben erfolgte nach vorheriger Information und Zustimmung der Patienten und wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät

genehmigt. Die Proben des linken Ventrikels wurden aus explantierten Herzen bei Herztransplantationen gewonnen, in flüssigem N<sub>2</sub> gelagert und von der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zur Verfügung gestellt.

Für die Untersuchung der mRNA- bzw. Protein-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten gp91<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup> und Nox4 wurden Patientenkollektive zusammengestellt, die sich lediglich in der Gabe von ACE-Hemmern, jedoch nicht in der Begleittherapie oder weiteren klinischen Parametern unterschieden (siehe Tab. 2.1).

**Tab. 2.1:** Patientenkollektive zur Untersuchung des Einflusses von ACE-Hemmer-Therapie auf die mRNA- bzw. Protein-Expression der NAD(P)H-Oxidase Untereinheiten in Gewebeproben des linken Ventrikels von Patienten mit Herzinsuffizienz. Die Patientenkollektive unterschieden sich in den klinischen Parametern und Begleittherapien (neben den ACE-Hemmern) nicht signifikant ( $P > 0,05$ ) voneinander.

	ohne ACE-Hemmer (n = 6)	mit ACE-Hemmer (n = 29)	P
Alter, in Jahren	48,3 ± 9,0	51,8 ± 8,3	0,371
Größe, in cm	171,0 ± 12,3	175,1 ± 6,5	0,242
Gewicht, in kg	76,0 ± 17,4	77,7 ± 10,6	0,748
New York Heart Association(NYHA)-Klassifizierung	3,7 ± 0,3	3,5 ± 5,1	0,315
Ejektionsfraktion, in %	24,4 ± 13,0	23,5 ± 7,7	0,832
Lungenkapillar-Verschlussdruck, in mm Hg	20,5 ± 10,1	19,5 ± 9,7	0,823
Herzindex	2,1 ± 0,7	2,3 ± 0,7	0,584
<u>Medikation, n (%):</u>			
ACE-Hemmer	-	29 (100)	< 0,001
AT <sub>1</sub> -Blocker	-	-	-
Cholesterinsynthese(CSE)-Hemmer	1 ( 17)	6 ( 21)	0,829
Kalzium-Antagonisten	1 ( 17)	1 ( 3)	0,216
β-Blocker	5 ( 83)	15 ( 52)	0,164
Diuretika	5 ( 83)	27 ( 93)	0,451
Nitrate	3 ( 50)	10 ( 34)	0,489
Herzglykoside	3 ( 50)	23 ( 79)	0,143
Antikoagulantien	5 ( 83)	26 ( 90)	0,669
Antidiabetika	1 ( 17)	3 ( 10)	0,669

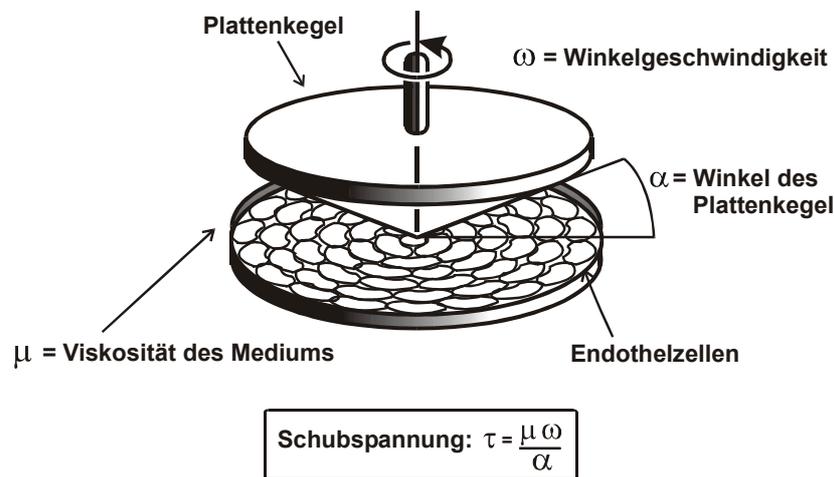
### 2.3 Applikation von Schubspannung auf Endothelzellen

Die Applikation von Schubspannung auf Endothelzellen erfolgte mit Hilfe eines nach Sdougos *et al.* (1984) modifizierten Plattenkegel-Viskometers (Morawietz *et al.*, 2000; Schubert *et al.*, 2000).

Das Plattenkegel-Viskosimeter wurde im Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung der Martin-Luther-Universität Halle angefertigt und ist in der Abb. 2.1 schematisch dargestellt. Er besteht aus einer Petrischalenhalterung, einem drehbaren Plattenkegel aus Polycarbonat mit Justiereinrichtung, einer Motor-Getriebe-Kombination und einer Steuereinrichtung zur

Einstellung der Geschwindigkeit des Plattenkegels. Der Winkel  $\alpha$  des Plattenkegels beträgt  $0,5^\circ$  und ermöglicht eine laminare Strömung des Mediums über den Endothelzellen.

Die Endothelzellen wurden nach Erreichen der Konfluenz in Endothelzellmedium mit 10% (v/v) Serum (siehe 2.2.1) ohne Dextran (bei anschließender Schubspannung von 1 - 10 dyn/cm<sup>2</sup>, d.h. 0,1 - 1 N/m<sup>2</sup>) bzw. mit 5% (w/v) Dextran (bei anschließender Schubspannung von 15 - 50 dyn/cm<sup>2</sup>, d.h. 1,5 - 5 N/m<sup>2</sup>) für 1 h inkubiert, in die Plattenkegel-Apparatur eingesetzt und mit der spezifischen Schubspannung behandelt. Die Zugabe von Dextran erhöht die Viskosität des Endothelzellmediums von 0,007 dyn · s/cm<sup>2</sup> auf 0,02065 dyn · s/cm<sup>2</sup> und verhindert einen Medienverlust durch zu hohe Fliehkräfte. Zu jeder Probe wurde eine stationäre Kontrolle mit identischem Medium für den gleichen Versuchszeitraum mitgeführt.



**Abb. 2.1:** Schematische Darstellung des Plattenkegel-Viskosimeters.

Für die Untersuchung der Signalmechanismen wurde dem verwendeten Endothelzellmedium 500 μM N<sup>G</sup>-Nitro-L-Argeninmethylester (L-NAME; Inhibitor der ·NO-Synthase), 1 μM BQ-788 (ET<sub>B</sub>-Rezeptor-Blocker), 1 μM Losartan (AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Blocker), 1 μM RO-31-8220 (Inhibitor der PKC; Calbiochem, Schwalbach) bzw. 1 μM Herbimycin A (Inhibitor der Tyrosinkinase; Calbiochem, Schwalbach) zugegeben. In weiteren Studien wurden stationäre Endothelzellen mit 500 μM 2,2'-Hydroxynitrosohydrazino-bis-ethanamin (DETA-NO; ·NO-Donor; Calbiochem, Schwalbach) für 24 h inkubiert.

## 2.4 Wasserqualität

Zur Herstellung von Lösungen und Reaktionsansätzen wurde dH<sub>2</sub>O verwendet (Aufbereitungsanlage der Firma Seralpur Delta UF, Seral, Ransbach-Baumbach).

Bei Ribonukleinsäure(RNA)-Analysen wurden die Lösungen und Reaktionsansätze mit dH<sub>2</sub>O angesetzt, das mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt wurde. Dazu wurde 1 l dH<sub>2</sub>O mit 100 µl DEPC über Nacht inkubiert und das DEPC anschließend durch Autoklavieren inaktiviert.

## 2.5 RNA-Isolation

### 2.5.1 RNA-Isolation aus humanen Endothelzellen mittels TRI REAGENT™

Die Isolation der RNA mittels TRI REAGENT™ basiert auf der Methode nach Chomczynski & Sacchi (1987).

Die Endothelzellen wurden nach Erreichen der Konfluenz 2 x mit PBS (siehe 2.2.1) gewaschen und mit TRI REAGENT™ (1 ml für eine 6 cm-Kulturschale) lysiert. Die Präparation der RNA erfolgte nach Anleitung der Firma Sigma (Deisenhofen). Die RNA wurde in 50 - 80 µl DEPC-Wasser (siehe 2.4) aufgenommen. Die RNA-Konzentration wurde spektrophotometrisch vermessen (siehe 2.6) und die Qualität der RNA im 1%igem (w/v) Agarosegel überprüft (siehe 2.10). Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

### 2.5.2 RNA-Isolation aus humanen Gewebeproben mittels Cäsiumchlorid-Ultrazentrifugation

Zur Isolation der RNA aus dem linken Ventrikel wurde die Methode von Chirgwin *et al.* (1979) verwendet.

Die Gewebeproben wurden nach der Explantation in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren, mechanisch zerkleinert, in Guanidiniumisothiocyanat-Lösung (4 M Guanidiniumisothiocyanat; 1% (w/v) N-Lauroylsarcosin; 25 mM Natriumacetat, pH 6,0; 1 mM Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat (EDTA), pH 6,5; 1 M β-Mercaptoethanol) suspendiert und anschließend mit dem Ultra-Turrax T8 (IKA, Staufen) homogenisiert. Für die Präparation wurde 1 ml CsCl-Lösung (5,7 M CsCl; 100 mM EDTA, pH 6,5; 6 mM β-Mercaptoethanol) in ein 4 ml-Zentrifugenröhrchen (Sorvall, Newtown, USA) gegeben und mit dem Homogenisat

überschichtet. Die Röhren wurden bei 100.000 x g in einer Ultrazentrifuge für 21 h bei 22°C zentrifugiert. Dabei sedimentiert die RNA durch das CsCl-Kissen, während Proteine und Desoxyribonukleinsäuren (DNA) im Überstand verbleiben. Der Überstand und das CsCl-Kissen wurden vorsichtig abgenommen und das RNA-Pellet in 400 µl TSPE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,0; 1% (w/v) N-Lauroylsarcosin; 5% (v/v) Phenol; 1 mM EDTA) gelöst. Die RNA wurde durch Zugabe von 40 µl 3 M Natriumacetat (pH 6,0) und 10 ml 96%igem (v/v) Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt und durch Zentrifugation bei 10.000 x g für 30 min bei -10°C sedimentiert. Das Pellet wurde in 300 µl DEPC-Wasser (siehe 2.4) gelöst. Die RNA wurde erneut über Nacht gefällt und sedimentiert. Das RNA-Pellet wurde zweimal mit 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend in 50 µl DEPC-Wasser gelöst. Die Konzentration der RNA wurde spektrophotometrisch bestimmt (siehe 2.6) und ihre Qualität im 1%igem (w/v) Agarosegel überprüft (siehe 2.10). Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

## 2.6 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen durch Absorptionsmessung

Um Qualität und Quantität von DNA- und RNA-Proben zu bestimmen, wurden diese 1:50 verdünnt und die Absorption bei 260 und 280 nm gemessen. Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde aus folgender Beziehung bestimmt: 1 OD = 50 µg/ml doppelsträngige DNA bzw. 1 OD = 40 µg/ml RNA. Der Quotient der Absorptionen entspricht dem Reinheitskoeffizient und zeigt Verunreinigungen mit Proteinen an. Er sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen (Sambrook *et al.*, 1989; Ausubel *et al.*, 1997).

## 2.7 Reverse Transkription

Bei der RT wurde RNA mit Hilfe der reversen Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Für eine RT wurde folgender Ansatz verwendet:

30 ng/µl <i>Random Primer</i>	4,0 µl
100 ng/µl Gesamt-RNA (siehe 2.5)	5,0 µl
DEPC-Wasser (siehe 2.4)	6,0 µl

Der Ansatz wurde 3 min bei 72°C inkubiert (Auflösen von Sekundärstrukturen der RNA) und auf 4°C abgekühlt. Dann wurde folgender Reaktion-Mix zugegeben:

5 × <i>First Strand Buffer</i>	5,0 µl
12,5 mM Desoxyribonukleosidtriphosphat(dNTP)-Mix	1,0 µl

10 mM Dithiothreitol (DTT)	2,5 µl
40 U/µl RNaseOUT™ Ribonuklease Inhibitor	0,5 µl
200 U/µl SuperScript™ II Reverse Transkriptase	0,2 µl
DEPC-Wasser	0,8 µl

Der Ansatz wurde für 1 h bei 42°C inkubiert, dann für 1 min auf 95°C erhitzt, um die Transkriptase zu inaktivieren, und anschließend auf 4°C abgekühlt.

## 2.8 Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR amplifiziert geringe Mengen DNA (Mullis & Faloona, 1987) und erlaubt somit im Gegensatz zur Northern-Hybridisierung die Quantifizierung der *messenger*-RNA (mRNA) auch gering exprimierter Gene. Bei der semiquantitativen PCR wählt man die optimale Zyklen-Anzahl aus, die sich in der Mitte des exponentiellen Bereich der Amplifizierung befindet.

Die Quantifizierung der mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> und Nox4 sowie der 18SrRNA erfolgte durch semiquantitative PCR. Für die 18SrRNA wurden 25 µl-PCR-Ansätze (mit 10 pmol/µl Primer) und für p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> und Nox4 50 µl-PCR-Ansätze (mit 20 pmol/µl Primer) angefertigt (siehe Tab. 2.2). Die für die semiquantitative PCR verwendeten *sense*- und *antisense*-Primer sind in der Tab. 2.3 und die PCR-Bedingungen in der Tab. 2.4 aufgelistet. Die PCR-Ansätze wurden mit Mineralöl überschichtet.

Die amplifizierte DNA wurde anschließend im 1%igem (w/v) Agarosegel aufgetrennt (siehe 2.10). Die Gele wurde fotografiert (MP4<sup>+</sup> Instant Camera System und Film Type 665; Polaroid, Cambridge, UK). Die Negative wurden mit einem Scanner (ScanMaker X6; Microtex, Ratingen) eingelesen und densitometrisch analysiert (Aida 2.0; Raytest, Straubenhardt).

**Tab. 2.2:** PCR-Ansätze für die semiquantitative PCR.

PCR-Komponenten	25 µl-PCR-Ansatz	50 µl-PCR-Ansatz
10 × rTaq-Polymerasepuffer	2,5 µl	5,0 µl
100 µM dNTP-Mix	3,0 µl	6,0 µl
10 bzw. 20 pmol/µl sense-Primer	1,0 µl	1,0 µl
10 bzw. 20 pmol/µl antisense-Primer	1,0 µl	1,0 µl
5 U/µl rTaq-DNA-Polymerase	0,2 µl	0,2 µl
cDNA (siehe 2.7)	1,0 µl	5,0 µl
steriles dH <sub>2</sub> O	16,3 µl	31,8 µl

**Tab. 2.3:** Primer für die semiquantitative PCR.

Gen	Genbank Acc.-Nr.	Primersequenz (3' → 5')	Bindungsstellen	Literaturverweis
p22 <sup>phox</sup>	NM 000101	sense: GAG TGG GCC ATG TGG GCC AAC G	41 - 62 bp	Lynn <i>et al.</i> (2000)
		antisense: GGA TGG TGG CCA GCA GGA AG	334 - 353 bp	
p47 <sup>phox</sup>	NM 000265	sense: CCC AGC CAG CAC TAT GTG TA	70 - 89 bp	Lynn <i>et al.</i> (2000)
		antisense: TGA TGT CTG TCG CGG TAC TC	450 - 469 bp	
Nox4	NM 016931	sense: TAA CCT CAA CTG CAG CCT TAT C	278 - 299 bp	modifiziert nach Wingler <i>et al.</i> (2001)
		antisense: CTT TTA TCC AAC AAT CTC CTG GTT CTC	362 - 388 bp	
18SrRNA	U 13369	sense: GTT GGT GGA GCG ATT TGT CTG G	5001 - 5022 bp	modifiziert nach Wingler <i>et al.</i> (2001)
		antisense: AGG GCA GGG ACT TAA TCA ACG C	5327 - 5348 bp	

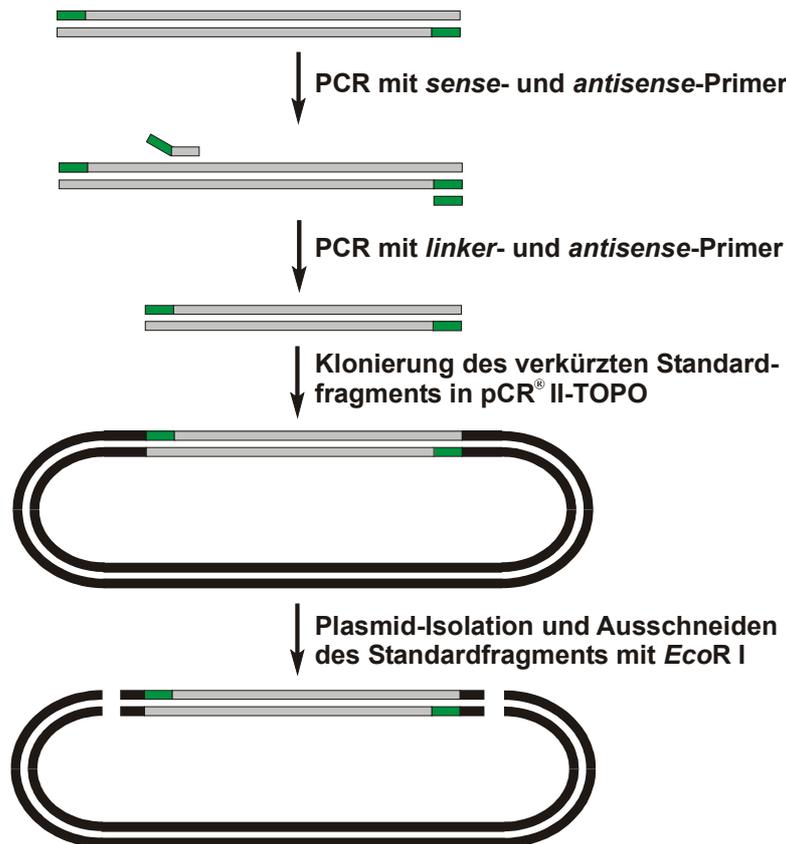
**Tab. 2.4:** PCR-Bedingungen für die semiquantitative PCR.

Gen	PCR-Bedingungen	Gen	PCR-Bedingungen
p22 <sup>phox</sup>	95°C 1 min	Nox4	95°C 1 min
	95°C 30 s		95°C 30 s
	64°C 30 s		63°C 30 s
	72°C 30 s		72°C 30 s
	72°C 2 min		72°C 2 min
	30 x		28 x
p47 <sup>phox</sup>	95°C 1 min	18SrRNA	95°C 1 min
	95°C 30 s		95°C 30 s
	66°C 30 s		60°C 30 s
	72°C 30 s		72°C 30 s
	72°C 2 min		72°C 2 min
	33 x		11 x

## 2.9 Standard-kalibrierte kompetitive Polymerase-Kettenreaktion

### 2.9.1 Konstruktion der internen Standards

Für die Quantifizierung der mRNA-Expression von p67<sup>phox</sup>, gp91<sup>phox</sup> und LOX-1 wurden intern deletierte Standardfragmente konstruiert. Diese Standards müssen die gleichen Bindungsstellen der für die Quantifizierung ausgewählten Primer besitzen. Um eine parallele Quantifizierung von Zielgen und Standard zu ermöglichen wird mit diesen Primern ein im Vergleich zum Zielgenfragment verkürztes Standardfragment amplifiziert. Zur Konstruktion von deletierten Standards wurde die *linker*-Primer-Methode verwendet (Forster, 1994). Die Standardkonstruktion ist schematisch in der Abb. 2.2 dargestellt.



**Abb. 2.2:** Schematische Darstellung der Standardkonstruktion für  $p67^{phox}$ ,  $gp91^{phox}$  und LOX-1.

**Tab. 2.5:** Primer für die Standardkonstruktion und standard-kalibrierte kompetitive PCR.

Gen	Genbank Acc.-Nr.	Primersequenz (3' → 5')	Bindungsstellen	Literaturverweis
$p67^{phox}$	NM 000433	sense: ATG CCT TCA GTG CCG TCC AG	147 - 166 bp	Rueckschloss (2001)
		antisense: TGC TTC CAG ACA CAC TCC ATC G	552 - 573 bp	
		linker: ATG CCT TCA GTG CCG TCC AG / G CTT ACT TCC AAC GAG GGA TGC	284 - 305 bp	Rueckschloss (2001)
$gp91^{phox}$	NM 000397	sense: GCT GTT CAA TGC TTG TGG CT	1106 - 1125 bp	Jones <i>et al.</i> (1994)
		antisense: TCT CCT CAT CAT GGT GCA CA	1490 - 1509 bp	Jones <i>et al.</i> (1994)
		linker: GCT GTT CAA TGC TTG TGG CT / G ATG TTA GTG GGA GCA GGG A	1226 - 1245 bp	
LOX-1	NM 002543	sense: GAA TGA GAA ATC CAA AGA GCA AAT G	400 - 424 bp	
		antisense: TGG GCT CTC ATG TTT GGC AC	959 - 978 bp	
		linker: GAA TGA GAA ATC CAA AGA GCA AAT G / TC CTC GGG CTC ATT TAA CTG G	536 - 556 bp	

**Tab. 2.6:** PCR-Bedingungen für die Standardkonstruktion und standard-kalibrierte kompetitive PCR.

Gen	PCR-Bedingungen	Gen	PCR-Bedingungen
p67 <sup>phox</sup>	95°C 1 min 95°C 30 s 67°C 15 s 72°C 15 s	LOX-1	95°C 1 min 95°C 30 s 62°C 15 s 72°C 15 s
	34 x		39 x
gp91 <sup>phox</sup>	95°C 1 min 95°C 30 s 63°C 15 s 72°C 15 s		
	33 x		

Zunächst wurde das p67<sup>phox</sup>-, gp91<sup>phox</sup>- und LOX-1-Fragment mit Hilfe der jeweiligen *sense*- und *antisense*-Primern in der PCR amplifiziert (siehe Tab. 2.5 und 2.6). Der 50 µl-PCR-Reaktionsansatz wurde wie in Tab. 2.2 beschrieben, angesetzt. Die amplifizierte DNA wurde im 1%igen (w/v) Agarosegel aufgetrennt (siehe 2.10) und anschließend durch Elektroelution aus dem Gel isoliert (siehe 2.11). Zur Isolation des verkürzten Standardfragments wurde die eluierte DNA in einer zweiten PCR mit den jeweiligen *linker*- und *antisense*-Primern (siehe Tab. 2.5) amplifiziert und im präparativem Agarosegel aufgetrennt.

### 2.9.2 Klonierung der Standardfragmente

Die Klonierung der Standardfragmente erfolgte mit Hilfe des TOPO™ TA Cloning® Kit der Firma Invitrogen (Karlsruhe).

Der pCR® II-TOPO-Vektor enthält ein Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion plasmidhaltiger *Escherichia coli* (*E. coli*). Der Nachweis rekombinanter Bakterien erfolgte durch β-Galaktosidase-Selektion mit Hilfe von 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktosid (X-Gal). Nach Integration von Fremd-DNA in den Vektor erscheinen die Kolonien rekombinanter Bakterien weiß, während die Kolonien der ausschließlich Plasmid-DNA enthaltenen Bakterien durch X-Gal-Spaltung und 5-Brom-4-chlorindigo-Bildung blaugefärbt sind. Die Klonierung erfolgte nach der Anleitung der Firma Invitrogen (Karlsruhe).

### 2.9.3 Plasmidisolation

Die Plasmidisolation mit Hilfe des Qiagen® Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden) basiert auf einem modifizierten Verfahren der basischen Lyse (Sambrook *et al.*, 1989) mit nachfolgender DNA-Separation über Säulen.

Die weißen Kolonien (siehe 2.9.2) von transformierten *E. coli* wurden mittels PCR (siehe 2.9.1) auf das Vorhandensein der jeweiligen DNA-Fragmente im Plasmid überprüft. Dazu wurden *E. coli* einer weißen Kolonie in sterilem dH<sub>2</sub>O suspendiert, 10 min gekocht und die DNA durch PCR analysiert. Von den Fragment-haltigen Klonen wurde anschließend das Plasmid isoliert. Die Plasmidisolierung erfolgte nach dem Protokoll der Firma Qiagen (Hilden). Die DNA-Sequenz des im Plasmid eingebauten Fragments wurde durch Sequenzierung überprüft (siehe 2.12).

#### 2.9.4 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Mit Hilfe des Restriktionsenzym *EcoR* I (Invitrogen, Karlsruhe) wurde das DNA-Fragment aus dem Plasmid isoliert. Der Restriktionsansatz wurde wie folgt hergestellt:

10 x Reaktionspuffer React 3 (Invitrogen, Karlsruhe)	10 µl
8 µg Plasmid (siehe 2.9.3)	x µl
10 U/µl <i>EcoR</i> I	4 µl
steriles dH <sub>2</sub> O	ad 100 µl

Der Restriktionsansatz wurde für 2 h bei 37°C inkubiert. Das Standardfragment wurde im 1%igem (w/v) Agarosegel vom Vektoranteil des Plasmides getrennt (siehe 2.10) und anschließend durch Elektroelution aus dem Agarosegel isoliert (siehe 2.11).

#### 2.9.5 Polymerase-Kettenreaktion mit internem Standard

Die Standard-DNA wurde in definierten Schritten verdünnt. Zur Bestimmung der mRNA-Expression von p67<sup>phox</sup>, gp91<sup>phox</sup> und LOX-1 wurden 1:5-Verdünnungen eingesetzt. Für jede Probe wurden 4 - 5 PCR-Ansätze vorbereitet:

10 × rTaq-Polymerasepuffer	5,0 µl
100 µM dNTP-Mix	6,0 µl
20 pmol/µl <i>sense</i> -Primer	1,0 µl
20 pmol/µl <i>antisense</i> -Primer	1,0 µl
5 U/µl rTaq-DNA-Polymerase	0,2 µl
steriles dH <sub>2</sub> O	26,8 µl
cDNA (siehe 2.7)	5,0 µl

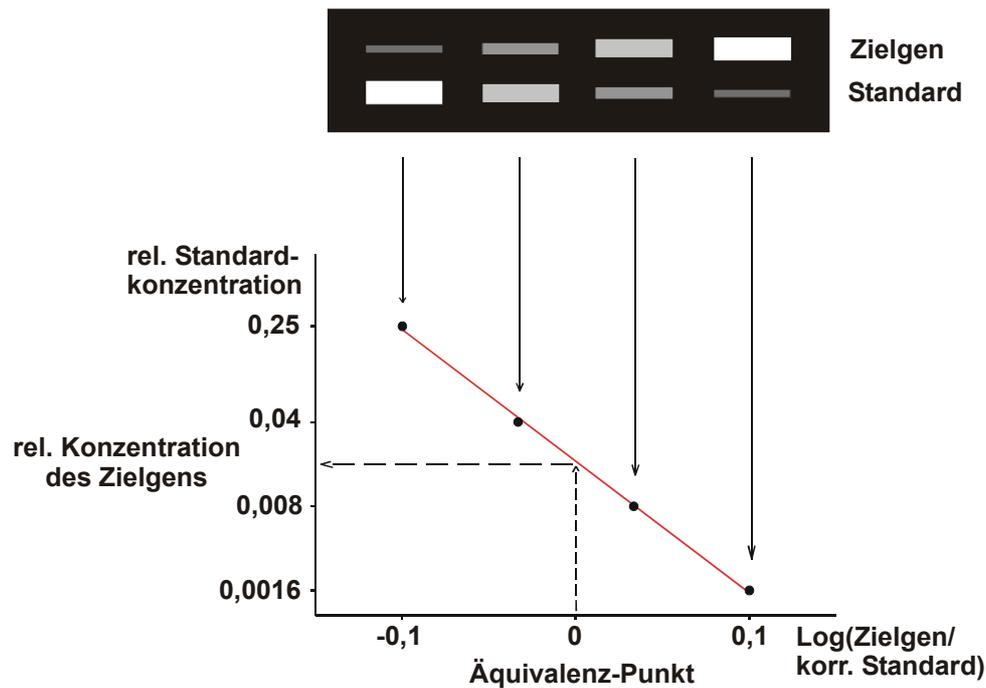
Es wurden 5 µl jeder Standard-DNA-Verdünnungsstufe in jeweils einen der vorbereiteten PCR-Ansätze gegeben. Die PCR wurden analog 2.9.1 durchgeführt.

In den PCR-Reaktionen kompetiert die cDNA des Zielgenfragments mit der Standard-DNA um die eingesetzten Primer, da sie identische Primerbindungsstellen besitzen. Beide werden entsprechend ihrem Verhältnis im PCR-Ansatz amplifiziert. Das Zielgen- und das intern deletierte Standardfragment jedes Ansatzes wurden durch die Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe 2.10). Die Gele wurde fotografiert, die Negative mit einem Scanner eingelesen und densitometrisch analysiert. Es wurde die Intensität des Zielgen- und des Standardfragments von jedem Ansatz bestimmt (siehe 2.8). Da das Standardfragment verkürzt ist, ist der Einbau von Ethidiumbromid und damit die Intensität des Standardfragments bei gleicher molarer Konzentration geringer als beim Zielgenfragment. Deshalb wurde die Intensität der Standardfragmente mit einem Korrekturfaktor multipliziert, der sich aus dem Längenverhältnis von Zielgen und Standard errechnet (siehe Tab. 2.7).

**Tab. 2.7:** Länge der in der kompetitiven PCR amplifizierten DNA-Fragmente und verwendete Korrekturfaktoren.

	p67 <sup>phox</sup>	gp91 <sup>phox</sup>	LOX-1
Zielgenfragment:	427 bp	404 bp	579 bp
Standardfragment:	310 bp	304 bp	468 bp
Korrekturfaktor:	1,38	1,33	1,24

Aus den Intensitäten dieser Fragmente wurde der Äquivalenzpunkt, an dem die molekularen Konzentrationen von Zielgen- und Standardfragment identisch sind, bestimmt. Dazu wurde das Verhältnis der Intensitäten von Zielgen und Standard in jedem PCR-Ansatz einer Probe ermittelt und der dekadische Logarithmus dieses Verhältnisses bestimmt. Diese Werte wurden gegen die im jeweiligen Ansatz enthaltene relative Standardkonzentration aufgetragen (siehe Abb. 2.3). Der Äquivalenz-Punkt lag im Nullpunkt der x-Achse. Mit Hilfe der Regressionsgeraden für die 4 - 5 PCR-Ansätze jeder Probe konnte so die Konzentration des Zielgens in der Probe bestimmt werden. Bei der Verwendung identischer Standardverdünnungen konnte die Zielgenkonzentrationen der einzelnen Proben miteinander verglichen werden.



**Abb. 2.3:** Schematische Darstellung der Auswertung einer kompetitiven PCR am Beispiel einer 1:5-Verdünnungsreihe der Standard-DNA. Für jeden PCR-Ansatz einer Probe wurde das Verhältnis der Intensitäten von Zielgen und Standard bestimmt. Der dekadische Logarithmus dieser Verhältnisse wurde gegen die im Ansatz enthaltene relative Standardkonzentration aufgetragen. Mit Hilfe der Regressionsgerade konnte die relative Zielgenkonzentration bestimmt werden, da die Konzentrationen von Zielgen und Standard im Äquivalenz-Punkt gleich sind.

## 2.10 Agarose-Gelelektrophorese

Die Nukleinsäuren (DNA bzw. RNA) können in Agarosegelen im elektrischen Feld entsprechend ihrer Länge aufgetrennt werden. Dabei wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren zur positiv geladenen Kathode. Die in den Nukleinsäuren interkalierten Ethidiumbromidmoleküle werden durch ultra-violettes(UV)-Licht zur Fluoreszenz anregt und so nachgewiesen.

Für die elektrophoretische Trennung von DNA und RNA wurde das Mini- bzw. Midi-Gel-Elektrophorese-System von MWG-Biotech (Ebersberg) verwendet. Dazu wurde 1% (w/v) Agarose durch Erhitzen in 1 x Tris-Borat-EDTA(TBE)-Puffer (89 mM Tris-HCl, pH 8,0; 89 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA, pH 8,0) gelöst. Nach Abkühlen der Lösung wurde Ethidiumbromid (1 µl/100 ml; Endkonz. 0,1 µg/ml) zugesetzt. Die Lösung wurde in einen vorbereiteten Gelträger gegossen. Das Gel wurde in eine mit 1 x TBE-Puffer gefüllte Gelkammer überführt. Die DNA- bzw. RNA-Proben wurden mit 0,1 Vol Probenpuffer (50% (v/v) 1 x Tris-EDTA(TE)-Puffer [10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0]; 50% (v/v)

Glycerol; 0,25% (w/v) Bromphenolblau) gemischt und die aufgetragenen Proben bei 8 - 10 V/cm getrennt. Die Länge der DNA-Fragmente wurde mit Hilfe parallel aufgetrennter DNA-Längenstandards (100 bp-Leiter; Invitrogen, Karlsruhe) bestimmt.

### **2.11 Elektroelution von Nukleinsäuren**

Nukleinsäuren können durch Elektroelution aus dem Agarosegel isoliert werden. Dabei wurde die Wanderung der Nukleinsäuren im elektrischen Feld ausgenutzt.

Die DNA-Fragmente wurden nach der elektrophoretischen Trennung in einem Agaroseblock aus dem Gel ausgeschnitten. Der Agaroseblock wurde in einen Dialyseschlauch (Spectra/Por<sup>®</sup>6, MWCO 1.000; Roth, Karlsruhe) überführt. Dieser wurde mit 1 x TE-Puffer gefüllt, an beiden Enden verschlossen und in eine mit 1 x TBE-Puffer (siehe 2.10) gefüllten Elektrophorese-Kammer gelegt. Die Nukleinsäuren wurden bei 8 - 10 V/cm aus dem Agaroseblock in den TE-Puffer transferiert. Der Puffer wurde entnommen und die enthaltenen Nukleinsäuren nach Zugabe von 0,1 Vol 3 M Ammoniumacetat-Lösung (pH 6,3) und 2,5 Vol 96%igem (v/v) Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Das nach Zentrifugation (16.000 x g, 20 min, 4°C) erhaltene Pellet wurde mit 500 µl 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend in einem geeigneten Volumen dH<sub>2</sub>O (steril) gelöst.

### **2.12 DNA-Sequenzierung**

Die Sequenzierung der DNA erfolgte nach der Kettenabbruch- bzw. Didesoxyribonukleosid-triphosphat(ddNTP)-Methode nach Sanger *et al.* (1977). Dazu wurde der Thermo Sequenase<sup>™</sup> Dye Terminator Cycle Sequencing Pre-Mix-Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) verwendet. Dieser enthält fluoreszenzmarkierte ddNTP, die in den DNA-Strang zufällig eingebaut werden und die DNA-Synthese abbrechen.

Die Reaktionsbedingungen wurden entsprechend dem Protokoll des Herstellers (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) gewählt. Die elektrophoretische Trennung der Probe und die Auswertung der Sequenzierungsreaktion erfolgte im Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung der Martin-Luther-Universität Halle mit einem ABI Prism 373 DNA Sequencer (Perkin Elmer, Weiterstadt). Die resultierenden Sequenzen wurden mit den aus Datenbanken bekannten Zielsequenzen verglichen.

## 2.13 Protein-Isolation

### 2.13.1 Protein-Isolation aus humanen Endothelzellen

Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Endothelzellen einer 6 cm-Kulturschale mit PBS (siehe 2.2.1) gewaschen und mit 100 µl Lyse-Puffer (siehe 2.2.3.) lysiert. Die DNA wurde 12 min bei 100°C denaturiert und bei 6.000 x g für 8 min sedimentiert. Die Konzentration der im Überstand enthaltenen Proteine wurde mittels BCA<sup>TM</sup> Protein Assay und Rinderserum-Albumin (BSA) als Standard (Pierce, Rockfort, USA) bestimmt. Je 50 µg Protein wurden in 1 x Lämmli-Puffer (4 x Lämmli-Puffer: 0,62 g DTT; 0,4 g SDS; 6 ml Glycerol; 2 ml 1,25 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,2 mg Bromphenolblau; ad 10 ml dH<sub>2</sub>O) aufgenommen.

### 2.13.2 Protein-Isolation aus humanem Myokardgewebe

Die gefrorenen Gewebestücke des linken Ventrikels (ca. 200 - 500 mg) wurden mechanisch zerkleinert und in eiskaltem 10 mM Hepes-Puffer (pH 7,4) mit 80 mM KCl, 1 M EDTA, 1 mM Ethylenglycol-bis-[aminoethylether]-N,N,N',N'-tetraacetat (EGTA), 4 mM DTT, 1:25 Proteinase-Inhibitor-Mix, 250 mM Sukrose und 0,01% (v/v) Triton X-100 mittels Ultra-Turrax T8 (IKA-Werke, Staufen) homogenisiert. Das Homogenat wurde bei 20.000 x g für 30 min zentrifugiert. Die Proteinkonzentration im Überstand wurde mittels BCA<sup>TM</sup> Protein Assay und BSA als Standard bestimmt. Je 50 µg bzw. 100 µg Protein wurden in 1 x Lämmli-Puffer (siehe 2.13.1) aufgenommen.

## 2.14 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Proteintrennung wurde das Mini-PROTEAN II Cell-System (Bio-Rad, München) verwendet. Die SDS-Gele wurden, wie in der Tab. 2.8 beschrieben, hergestellt. Nach Polymerisation der Gele wurde die Gelkassette in die Elektrophorese-Kammer mit 1 x Laufpuffer (4 x Laufpuffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8,8; 380 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS) überführt. Die Proteinproben wurden 8 min bei 80°C denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde zunächst bei einer Feldstärke von 14 V/cm durchgeführt, bis der Bromphenolblau-Farbstoff das Trenngel erreichte. Anschließend wurde die Feldstärke auf 24 V/cm erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald der Bromphenolblau-Farbstoff den unteren Gelrand erreicht hatte. Das Molekulargewicht der Proteine wurde mit Hilfe

parallel aufgetrennter Proteinstandards mit bekannten Molekulargewichte (BENCHMARK™; Invitrogen, Karlsruhe) bestimmt.

**Tab. 2.8:** Zusammensetzung der Polyacrylamidgele.

Substanz:	Sammelgel	Trenngel (10%ig)
40 % (w/w) Acrylamid-Bisacrylamid (19:1)	1,0 ml	3,0 ml
Sammelgelpuffer (1 M Tris-HCl, pH 6,8)	1,0 ml	-
Trenngelpuffer (1 M Tris-HCl, pH 8,8)	-	4,5 ml
dH <sub>2</sub> O	5,9 ml	4,3 ml
10% (w/v) SDS	80,0 µl	120,0 µl
10% (w/v) Ammoniumpersulfat (Merck, Darmstadt)	50,0 µl	100,0 µl
TEMED	10,0 µl	10,0 µl

## 2.15 Western-Blot

### 2.15.1 Elektrophoretischer Proteintransfer

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrocellulose-Membran (0,45 µm; Schleicher & Schuell, Dassel) transferiert. Dazu wurde das Mini Trans-Blot Transfer Cell-System (Bio-Rad, München) verwendet. Die Nitrocellulose-Membran und 4 x 3MM Whatman-Papier (Whatman International Ltd., Maidstone, England) wurden auf Gelgröße (5 x 8,5 cm) zugeschnitten und 15 min in Transferpuffer (25 mM Tris-HCl, pH 8,2; 192 mM Glycin; 20% (v/v) Methanol; 0,1% (w/v) SDS) äquilibriert. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde das Proteingel 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Der Wet-Blot wurde nach dem Protokoll der Firma Bio-Rad (München) durchgeführt. Die Proteine wurden 20 min bei 350 mA (für 2 Gele) aus dem Proteingel auf die Nitrocellulose-Membran transferiert. Anschließend wurde das Proteingel mit Coomassie-Farblösung (0,5 g Coomassiebrillantblau G-250 gelöst in 500 ml Methanol; Zugabe von 100 ml Essigsäure und 400 ml dH<sub>2</sub>O) über Nacht gefärbt und mit Entfärberlösung (20% (v/v) Ethanol; 1% (v/v) Essigsäure) differenziert. Die Nitrocellulose-Membran wurde mit Ponceau-S-Farblösung [0,5 g Ponceau S gelöst in 1 ml Essigsäure; Zugabe von 100 ml dH<sub>2</sub>O; (Salinovich & Montelaro, 1986)] gefärbt, um die Effizienz des Proteintransfers zu überprüfen.

### 2.15.2 Proteinnachweis

Die Nitrocellulose-Membran wurde nach dem Proteintransfer über Nacht bei 4°C in Tris-gepufferter Salzlösung + Tween (TBS-T: 10 mM Tris-HCl, pH 7,3; 500 mM NaCl; 0,2% (v/v) Tween 20) + 3% (w/v) Milchpulver (fettfrei, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)

inkubiert. Danach wurde die Membran 3 x 5 min mit TBS-T-Puffer gewaschen und anschließend mit dem jeweiligen primären Antikörper (siehe Tab. 2.9) für 3 h inkubiert. Dazu wurde der primäre Antikörper in TBS-T-Puffer + 3% (w/v) Milchpulver + 0,02% (w/v)  $\text{NaN}_3$  verdünnt. Anschließend wurde die Membran 5 x 5 min mit TBS-T-Puffer gewaschen und mit dem jeweiligen sekundären Antikörper (siehe Tab. 2.9) für 30 min inkubiert. Danach wurden 5 x 5 min Waschschrte mit TBS-T-Puffer durchgeführt.

Der Western-Blot zum Nachweis von Nox4 wurde im Labor von Herrn Prof. Dr. H. H. H. W. Schmidt (Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie, Justus-Liebig-Universität Giessen) durchgeführt.

**Tab. 2.9:** Verwendete primäre und sekundäre Antikörper.

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Endkonzentration
primäre Antikörper:			
p22 <sup>phox</sup>	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)	1: 250	0,80 µg/ml
p47 <sup>phox</sup>	BD Biosciences Transduction Lab. (Heidelberg)	1: 250	1,00 µg/ml
p67 <sup>phox</sup>	BD Biosciences Transduction Lab. (Heidelberg)	1: 500	0,50 µg/ml
gp91 <sup>phox</sup>	Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA)	1: 250	4,00 µg/ml
Nox4	Prof. Dr. H. H. H. W. Schmidt (Giessen)	k. A.	k. A.
LOX-1	Prof. Dr. T. Sawamura (Kyoto, Japan)	1: 1.000	k. A.
sekundäre Antikörper (Meerrettichperoxidase-Konjugate):			
Anti-Maus-IgG	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)	1:10.000	k. A.
Anti-Kaninchen-IgG	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)	1:10.000	k. A.
Anti-Ziege-IgG	Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA)	1: 7.500	0,05 µg/ml

### 2.15.3 Chemilumineszenz-Reaktion mit dem ECL-System

Die sekundären Antikörper sind mit Meerrettichperoxidase markiert. Bei Zugabe geeigneter Substrate bildet das Enzym ein Licht-emittierendes Produkt, das am Ort seiner Entstehung Licht ausstrahlt (Chemilumineszenz).

Für die Chemilumineszenz-Reaktion wurde das ECL Western-Blot Detektion-System (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) verwendet. Die ECL Western Blot-Reagenzien A und B wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und 1 min auf die Nitrocellulose-Membran gegeben (1 ml/Proteingel). Die Membran wurde anschließend in Frischhaltefolie verpackt und in eine Röntgenfilm-Kassette mit einem Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) gelegt. Der Film wurden 3 min - 24 h belichtet und danach in einer Curix 160-Apparatur (AGFA, Köln) entwickelt.

## 2.16 Bestimmung der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität

### 2.16.1 Bestimmung der Superoxidanionen-Bildung durch die Coelenterazin-vermittelte Chemilumineszenz

Das Coelenterazin wird durch die Reaktion mit  $\cdot\text{O}_2^-$  in die Licht-emittierende Form (Coelenteramid) umgewandelt. Diese Chemilumineszenz kann bei 466 nm im Chemiluminometer quantifiziert werden.

Die Sensitivität von Coelenterazin im Vergleich zu Lucigenin wurde mit Hilfe des Xanthin-Oxidase/Xanthin-Systems überprüft. Dazu wurden ein 1 ml-Reaktionsansatz mit 50  $\mu\text{U/ml}$  Xanthin-Oxidase (aus Buttermilch), 10  $\mu\text{M}$  Lucigenin (Molecular Probes, Eugene, OR, USA; gelöst in 20 mM Tris-HCl, pH 7,4) bzw. 10  $\mu\text{M}$  Coelenterazin [Molecular Probes, Eugene, OR, USA; gelöst in 96%igem (v/v) Ethanol] in 20 mM Tris-HCl, pH 7,4 hergestellt. Die Bildung von  $\cdot\text{O}_2^-$  wurde durch die Zugabe von 200  $\mu\text{M}$  Xanthin (gelöst in 0,01 mM NaOH) gestartet. Die dabei entstehende Chemilumineszenz wurde 5 min bei 25°C im Lumat LB 9501-Chemiluminometer (550 nm; EG & G Berthold, Wildbad) gemessen. Die Spezifität der nachgewiesenen Chemilumineszenz wurde mit SOD (40  $\mu\text{g/ml}$ ; aus Rinder-Erythrozyten; gelöst in PBS; siehe 2.2.1) bzw. Diphenyliodoniumchlorid [500  $\mu\text{M}$ ; gelöst in 50%igem (v/v) Ethanol] überprüft.

Für die Bestimmung der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität durch die Coelenterazin-vermittelte Chemilumineszenz wurden die humanen Endothelzellen in Pyrex-Röhrchen kultiviert (siehe 2.2.2). Nach ET-1-Stimulation wurden die Zellen mit PBS (siehe 2.2.1) gewaschen. Für die Bestimmung der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität wurde das Pyrex-Röhrchen mit Endothelzellen in 980  $\mu\text{l}$  PBS in das Chemiluminometer überführt. Die Messung wurde mit 10  $\mu\text{M}$  Coelenterazin gestartet. Nach drei Minuten wurden 100  $\mu\text{M}$  NADPH (Boehringer, Mannheim; gelöst in PBS) oder 40  $\mu\text{g/ml}$  SOD zugeben und die Chemilumineszenz 5 min weiter aufgezeichnet. Die Aktivität wurde auf den Proteingehalt der Kulturen mittels BCA Protein Assay Reagent Kit und BSA als Standard normalisiert.

Der Flavoenzym-Inhibitor Diphenyliodoniumchlorid kann die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase hemmen. Zur Bestimmung der spezifischen NAD(P)H-Oxidase-Aktivität wurden in einigen Experimenten die Endothelzellen 30 min vor der ET-1-Stimulation mit 500  $\mu\text{M}$  Diphenyliodoniumchlorid inkubiert.

### 2.16.2 Bestimmung der Superoxidanionen-Bildung durch die Cytochrom c-Nachweismethode

Die Cytochrom c-Nachweismethode beruht auf der Reduktion von Cytochrom c ( $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ ) durch  $\cdot\text{O}_2^-$ . Das Differenzspektrum aus oxidiertem und reduziertem Cytochrom c zeigt bei 550 nm ein Absorptionsmaximum. Bei dieser Wellenlänge kann die Generierung von  $\cdot\text{O}_2^-$  spektrophotometrisch verfolgt werden.

Die oxidierte Form von Cytochrom c kann jedoch nicht nur durch  $\cdot\text{O}_2^-$  reduziert werden. Andere Reduktionsmittel (z.B.: Glutathion, Cystein) können für die Reduktion von Cytochrom c ebenfalls verantwortlich sein. Die reduzierte Form von Cytochrom c kann durch Oxidationsmittel im Medium (u.a.  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) auch wieder re-oxidiert werden. Der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Anteil kann spezifisch nach Zugabe von SOD und CAT zu den Endothelzellen bestimmt werden. Die SOD wandelt dabei das  $\cdot\text{O}_2^-$  in  $\text{H}_2\text{O}_2$  und die CAT das entstehende  $\text{H}_2\text{O}_2$  in  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{O}_2$  um. Dadurch ändert sich die Cytochrom c-Absorption im Gegensatz zu den ohne SOD und CAT behandelten Zellen um den  $\cdot\text{O}_2^-$ -Anteil.

Die Cytochrom c-Nachweismethode wurde zur Quantifizierung der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung mit (A) und ohne Schubspannung (D) in humanen Endothelzellen über 24 h gemessen. Die Durchführung des Cytochrom c-Assays ist in der Abb. 2.4 schematisch dargestellt. Nach Beendigung des Cytochrom c-Assays wurde der Proteingehalt der Kulturen durch BCA Protein Assay Reagent Kit und BSA-Standards bestimmt.

Die  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung der Endothelzellen wurde anschließend berechnet:

$$A_{\text{Kulturschale A}} - A_{\text{Kulturschale C}} = \Delta A_{A-C}$$

$$A_{\text{Kulturschale B}} - A_{\text{Kulturschale C}} = \Delta A_{B-C}$$

$$A_{\text{Kulturschale D}} - A_{\text{Kulturschale F}} = \Delta A_{D-F}$$

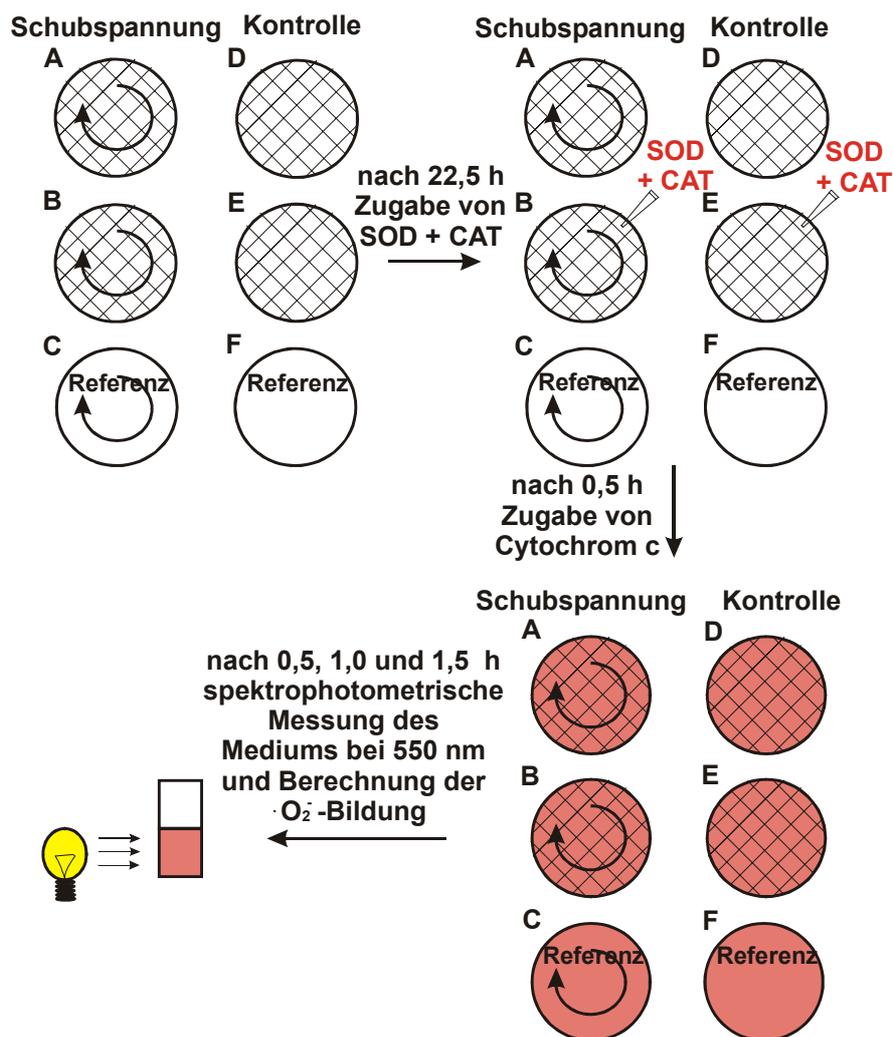
$$A_{\text{Kulturschale E}} - A_{\text{Kulturschale F}} = \Delta A_{E-F}$$

$$\cdot\text{O}_2^- \text{ Schubspannung} = (\Delta A_{A-C} / \varepsilon \cdot d / \text{Proteinkonz.}_A) - (\Delta A_{B-C} / \varepsilon \cdot d / \text{Proteinkonz.}_B)$$

$$\cdot\text{O}_2^- \text{ Kontrolle} = (\Delta A_{D-F} / \varepsilon \cdot d / \text{Proteinkonz.}_D) - (\Delta A_{E-F} / \varepsilon \cdot d / \text{Proteinkonz.}_E)$$

$\varepsilon$  = Extinktionskoeffizient von Cytochrom c ( $29,51 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , lt. Angaben des Herstellers)

$d$  = Schichtdicke der Küvette (1 cm)



**Abb. 2.4:** Schematische Darstellung der Cytochrom c-Nachweismethode. Kulturschalen mit Endothelzellen (A, B, D und E) wurden mit 4 ml Testmedium [1 x farbloses Medium 199, pH 7,4 (Invitrogen, Karlsruhe); 10% (v/v) *newborn calf*-Serum; 15 mM Hepes; 1 x Antibiotika/Antimykotika; 1:100 Fungizone<sup>®</sup>; 1:100 *endothelial cell growth supplement* (siehe 2.2.1); 5% (w/v) Dextran] beschichtet. Die Endothelzellen von zwei Kulturschalen (A und B) wurden mit einer Schubspannung von 30 dyn/cm<sup>2</sup> behandelt (siehe 2.3). Als Referenzen wurde analog Testmedium ohne Endothelzellen inkubiert (C und F). Eine Referenz (C) wurde ebenfalls mit Schubspannung behandelt. Nach 22,5 h wurden in die Kulturschalen B und E 40 µg/ml SOD (siehe 2.16.1) und 380 U/ml CAT (aus Rinderleber; ICN, Eschwege) gegeben, um den  $\cdot\text{O}_2^-$ -Anteil an der Gesamtreduktion des Cytochrom c in Endothelzellen mit und ohne Schubspannung zu ermitteln. Die Applikation von Schubspannung wurde dabei nicht unterbrochen. Nach 0,5 h wurde in alle Kulturschalen 40 µM Cytochrom c gegeben. Nach weiteren 0,5, 1,0 und 1,5 h wurden jeweils 300 µl des Mediums entnommen und bei 550 nm vermessen.

### 2.16.3 Bestimmung der Superoxidanionen-Bildung durch die ESR-Spektroskopie

Sowohl 5-Diethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrrolin-N-oxid (DEPMPO) als auch 5,5-Dimethylpyrrolin-N-oxid (DMPO) können  $\cdot\text{O}_2^-$  und  $\cdot\text{OH}$  binden und erzeugen als Addukt spezifische Elektronen-Spin-Resonanz(ESR)-Spektren.

Die Sensitivität von DEPMPO und DMPO wurde mittels der  $\cdot\text{OH}$ -generierenden Fenton-Reaktion überprüft. Hierfür wurde ein 100  $\mu\text{l}$ -Reaktionsansatz mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$  + 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  + 50 mM DEPMPO (Calbiochem, Schwalbach) bzw. DMPO hergestellt und im Miniskop 100 (Magnettech GmbH, Berlin) bei folgenden Einstellungen vermessen: 100 G *sweep*-Weite, 60 s *sweep*-Zeit, 1 Zyklus, 1 G modulierende Amplitude, 3 dB Dämpfung, 100fache Verstärkung, 3355 G Feldmitte.

Die gefrorenen Gewebestücke vom linken Ventrikel (100 mg) wurden wie unter 2.13.2 beschrieben in PBS (siehe 2.2.1) homogenisiert. Für die Bestimmung der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung wurde 1/10 Homogenat mit 850  $\mu\text{M}$  NADH (Boehringer, Mannheim) und 50 mM DMPO gemischt und die entstehenden  $\cdot\text{OH}$ -DMPO-Addukte wie oben beschrieben, vermessen.

### 2.17 Bestimmung der oxLDL-Aufnahme

LDL wurde durch sequenzielle Ultrazentrifugation aus humanen Plasma isoliert, mit  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu oxLDL oxidiert (Galle & Wanner, 1998) und freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. J. Galle (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt. Das oxLDL wurde mit 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyaninperchlorat (DiI, Molecular Probes) markiert und zur Quantifizierung der oxLDL-Aufnahme eingesetzt (Stephan & Yurachek, 1993; Sawamura *et al.*, 1997). Die HUVEC wurden mit ET-1 stimuliert (siehe 2.2.1) bzw. im Plattenkegel-Viskosimeter mit Schubspannung behandelt (siehe 2.3) und 5 h mit 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DiI-markiertem oxLDL inkubiert. Das aufgenommene DiI-markierte oxLDL wurde mit Isopropanol extrahiert und die Fluoreszenz bestimmt (520/564 nm). Die Fluoreszenzwerte wurden auf den Proteingehalt der Proben mittels BCA Protein Assay Reagent Kit und BSA-Standards normalisiert. Die Spezifität der Aufnahme wurde durch Kompetition mit nicht markierten oxLDL nachgewiesen.

## 2.18 Statistik

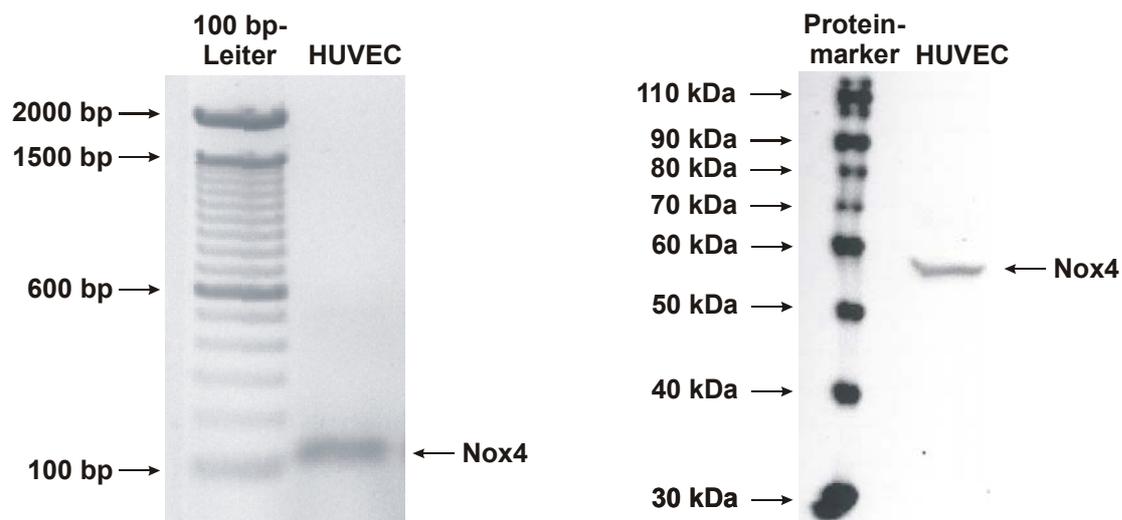
Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des *t*-Testes bzw. der ANOVA-Methode (SigmaStat software, SPSS Inc., Chicago). Ein Wert von  $P < 0,05$  wurde als statistisch signifikant und  $P < 0,01$  als hochsignifikant betrachtet.

### 3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression und Aktivität des NAD(P)H-Oxidase-Komplexes und des oxLDL-Rezeptors LOX-1 untersucht. Schwerpunkte bildeten dabei der Einfluss von ET-1, Ang II und Schubspannung in humanen Endothelzellen sowie von ACE-Hemmer-Therapie im Myokard von Patienten mit Herzinsuffizienz.

#### 3.1 Expression von Nox4 in humanen Endothelzellen

Die Expression der gp91<sup>phox</sup>-homologen NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit Nox4 wurde auf mRNA- und Proteinebene in Primärkulturen von humanen Endothelzellen untersucht. Durch RT-PCR- und Western-Blot-Analysen konnte erstmalig die Expression von Nox4 in HUVEC nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.1).



**Abb. 3.1:** Nachweis der Expression von Nox4 in HUVEC. Die RNA und die Proteine wurden aus den Endothelzellen isoliert. Die mRNA-Expression von Nox4 wurde durch RT-PCR, Auftrennung des PCR-Produktes im Agarosegel und Ethidiumbromid-Färbung nachgewiesen (links). Das Nox4-Protein wurde durch Western-Blot-Analyse mit spezifischen Antikörpern identifiziert (rechts).

In der Arbeit wurde daher neben den NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> und gp91<sup>phox</sup> auch die Regulation von Nox4 durch ET-1 und laminare Schubspannung untersucht.

### 3.2 Einfluss von ET-1 auf die Regulation der NAD(P)H-Oxidase und LOX-1

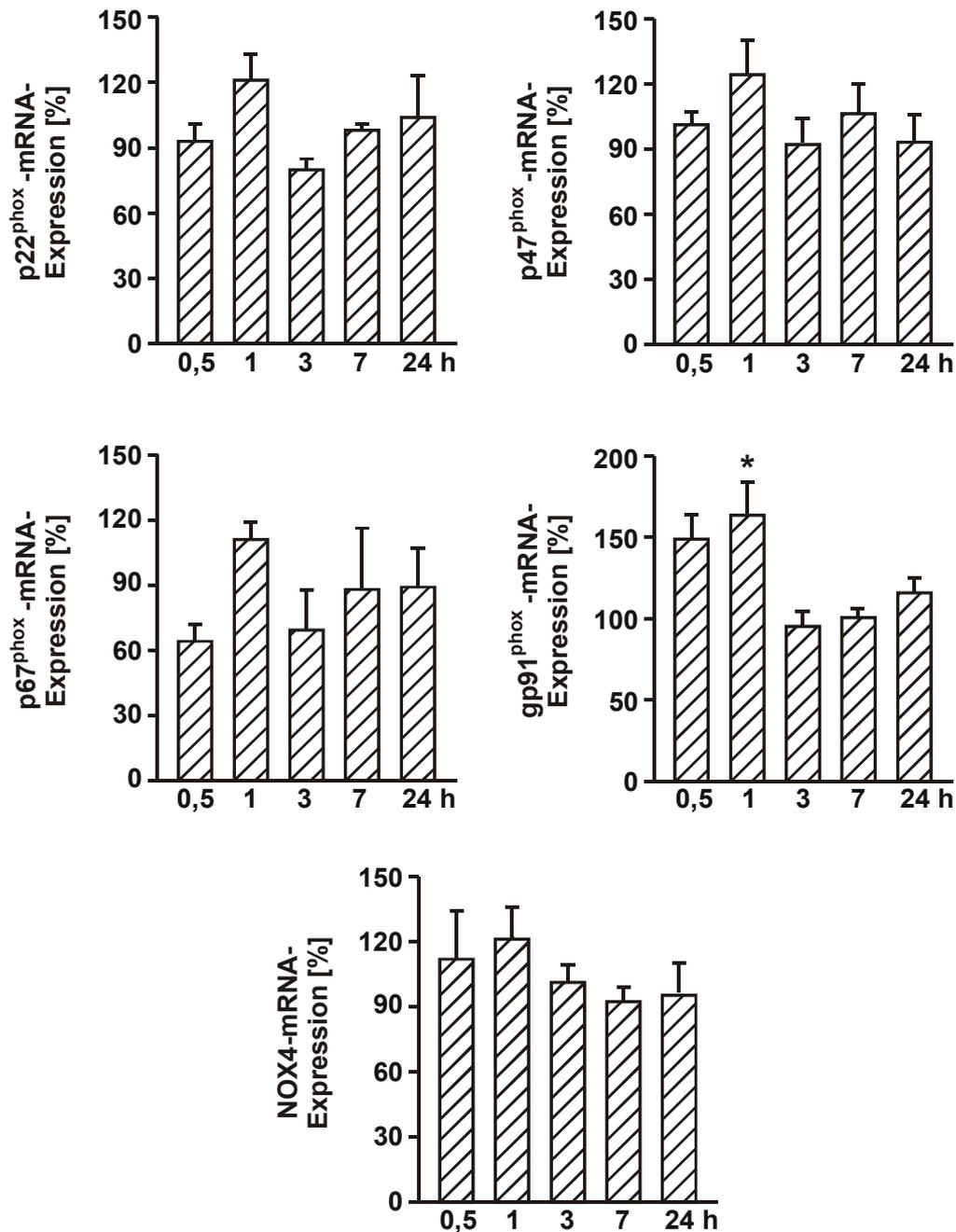
ET-1 und oxLDL werden als pro-arteriosklerotische Stimuli angesehen. Die Aufnahme von oxLDL in die Zelle wird durch den LOX-1-Rezeptor vermittelt. In diesem Teil der Arbeit wurde daher der Einfluss von ET-1 auf die Regulation der endothelialen NAD(P)H-Oxidase und LOX-1 untersucht.

#### 3.2.1 Regulation der endothelialen NAD(P)H-Oxidase durch ET-1

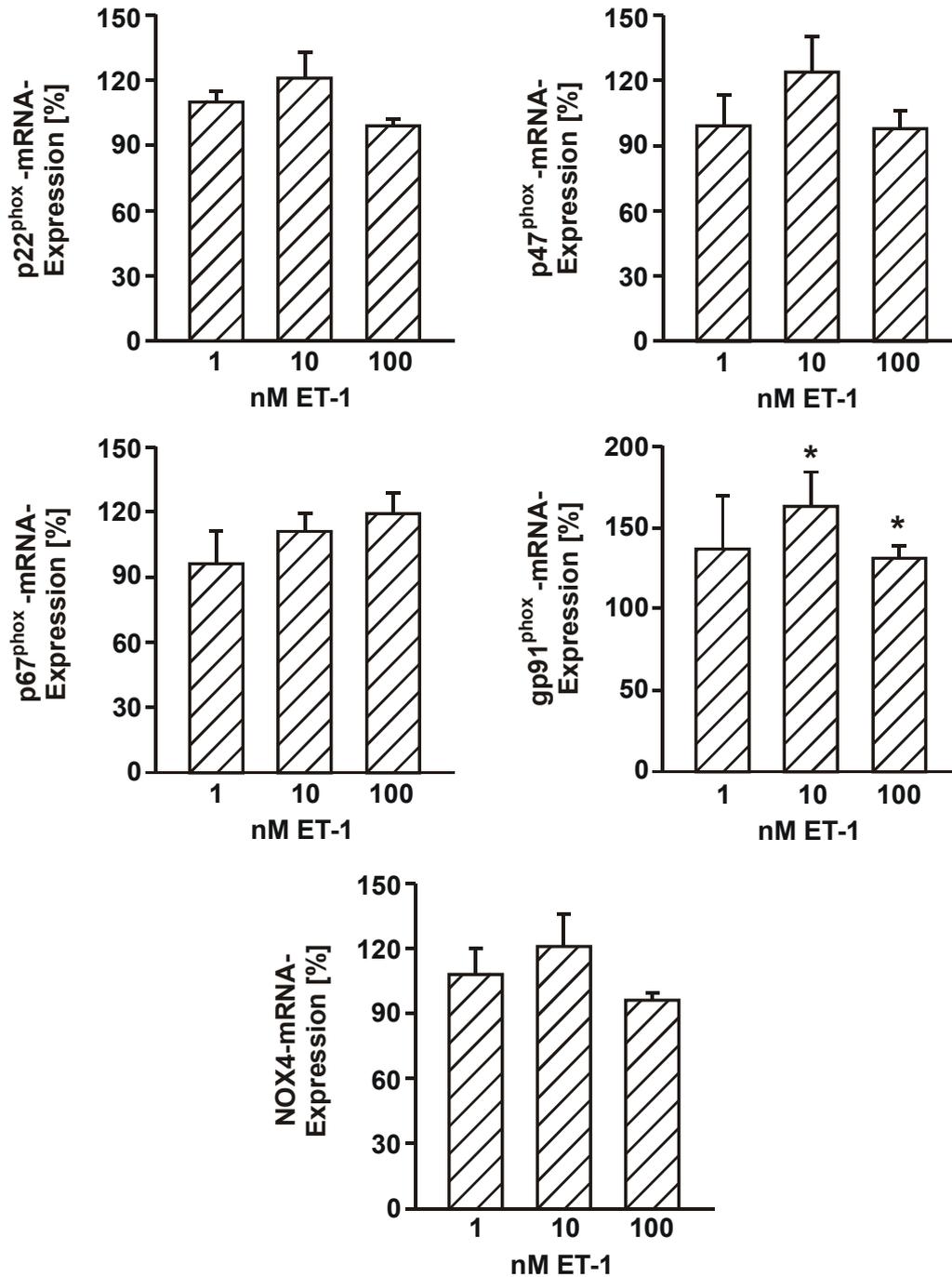
Zunächst wurde die Regulation der mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, gp91<sup>phox</sup> und Nox4 durch ET-1 untersucht. Dazu wurden Primärkulturen von HUVEC zeit- und konzentrationsabhängig mit ET-1 inkubiert. Anschließend wurde die RNA isoliert und die mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten durch standard-kalibrierte kompetitive bzw. semiquantitative RT-PCR quantifiziert.

ET-1 (10 nM) induzierte die mRNA-Expression von gp91<sup>phox</sup> bereits nach 1 h in HUVEC (163 ± 21% Kontrolle, n = 6, P < 0,05). Nach 3 h Inkubation mit ET-1 wurde das Kontrollniveau wieder erreicht. Die Induktion der mRNA-Expression von gp91<sup>phox</sup> durch ET-1 ist konzentrationsabhängig. Die Induktion erreichte bei einer ET-1-Konzentration von 10 nM ihr Maximum. Die mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> und p67<sup>phox</sup> sowie Nox4 wurde dagegen nicht zeit- bzw. konzentrationsabhängig durch ET-1 reguliert (siehe Abb. 3.2 und 3.3).

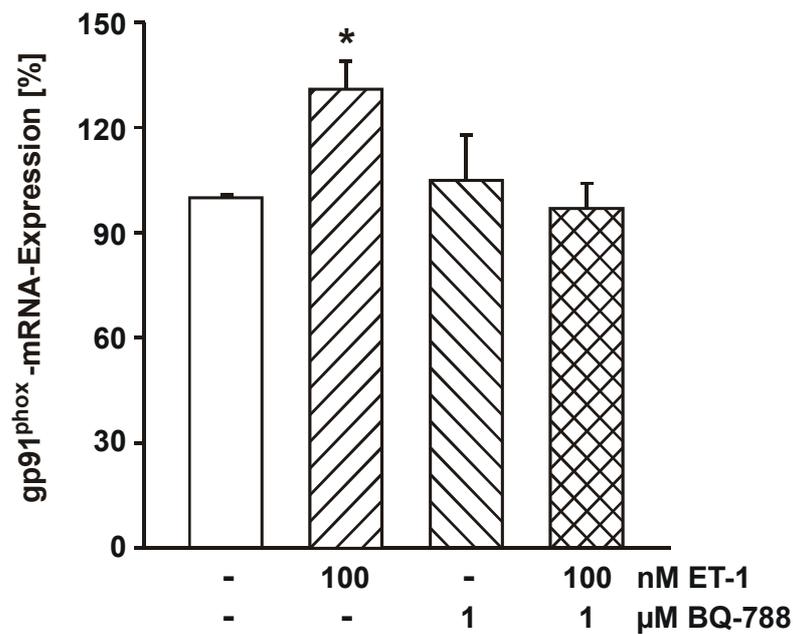
Die ET-1-induzierte gp91<sup>phox</sup>-mRNA-Expression wird durch den ET<sub>B</sub>-Rezeptor vermittelt. Der ET<sub>B</sub>-spezifische Inhibitor BQ-788 (1 µM) hatte keinen Einfluss auf die basale gp91<sup>phox</sup>-mRNA-Expression (105 ± 13% Kontrolle, n = 3), verhinderte jedoch die ET-1-induzierte gp91<sup>phox</sup>-mRNA-Expression (97 ± 7% Kontrolle, n = 3, siehe Abb. 3.4).



**Abb. 3.2:** Zeitabhängige Regulation der mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, gp91<sup>phox</sup> und Nox4 durch ET-1 in humanen Endothelzellen. Die HUVEC wurden mit 10 nM ET-1 für 0,5 - 24 h stimuliert. Die RNA wurde isoliert und die mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten durch standard-kalibrierte kompetitive bzw. semiquantitative RT-PCR quantifiziert (in % Kontrolle, n ≥ 3, \*P < 0,05 zu Kontrolle).

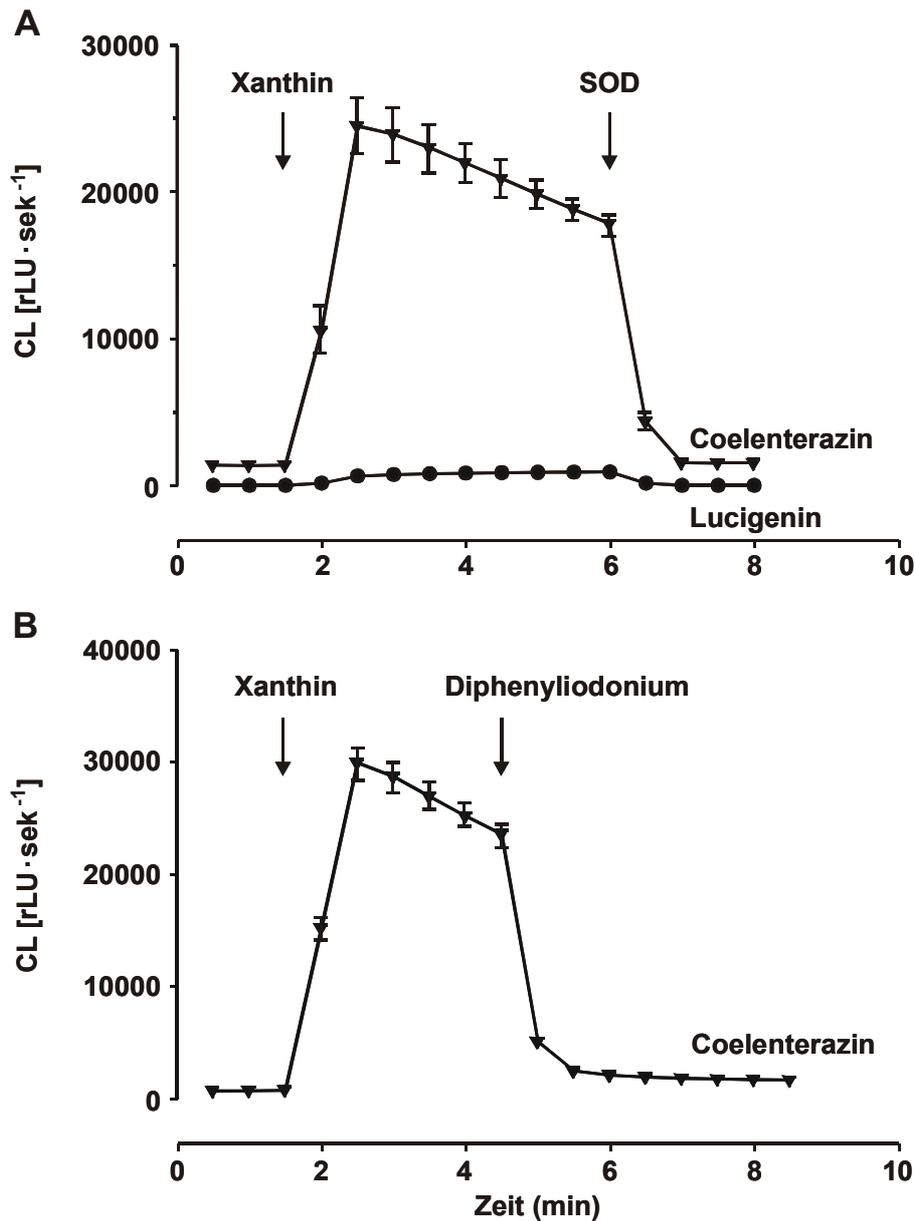


**Abb. 3.3:** Konzentrationsabhängige Regulation der mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, gp91<sup>phox</sup> und Nox4 durch ET-1 in humanen Endothelzellen. Die HUVEC wurden mit 1 - 100 nM ET-1 für 1 h stimuliert. Die RNA wurde isoliert und die mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten durch standard-kalibrierte kompetitive bzw. semiquantitative RT-PCR quantifiziert (in % Kontrolle, n ≥ 3, \*P < 0,05 zu Kontrolle).



**Abb. 3.4:** ET<sub>B</sub>-spezifische Inhibierung der ET-1-induzierten gp91<sup>phox</sup>-mRNA-Expression. Die HUVEC wurden mit 100 nM ET-1, mit 1 μM BQ-788 bzw. mit 100 nM ET-1 und 1 μM BQ-788 für 1 h inkubiert. Die RNA wurde isoliert und die mRNA-Expression von gp91<sup>phox</sup> durch standard-kalibrierte kompetitive RT-PCR quantifiziert (in % Kontrolle, n ≥ 3, \*P < 0,05 zu Kontrolle).

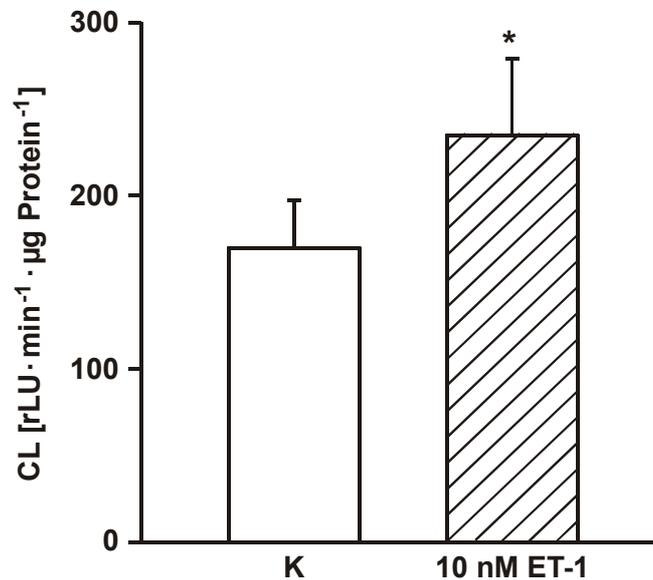
In weitergehenden Experimenten wurde der Einfluss von ET-1 auf die NAD(P)H-Oxidase-Aktivität untersucht. Die NAD(P)H-Oxidase-vermittelte  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung konnte durch Chemilumineszenz nachgewiesen werden. Coelenterazin bzw. Lucigenin werden dabei durch die Reaktion mit  $\cdot\text{O}_2^-$  in eine Licht-emittierende Form umgewandelt. Die Spezifität und Sensitivität dieser Licht-emittierenden Substanzen wurden mit Hilfe der  $\cdot\text{O}_2^-$ -bildenden Xanthin-Oxidase und Xanthin als Substrat überprüft. Dabei erwies sich die Coelenterazin-vermittelte Chemilumineszenz als eine für  $\cdot\text{O}_2^-$  spezifische und sensitive Nachweismethode. Im Gegensatz zu Lucigenin zeigte die Coelenterazin-vermittelte Chemilumineszenz ein bis zu 25.000fach erhöhtes Signal. Dieses Signal konnte durch die SOD bzw. Diphenyliodoniumchlorid, einem Flavoenzym-Inhibitor, vollständig gehemmt werden (Abb. 3.5).



**Abb. 3.5:** (A) Vergleich der Sensitivität von Coelenterazin und Lucigenin zur  $\cdot\text{O}_2^-$ -Detektion am Beispiel des Xanthin-Oxidase/Xanthin-Modellsystems. Coelenterazin und Lucigenin wurden in gleichen Konzentrationen ( $10\ \mu\text{M}$ ) eingesetzt. Die Xanthin-Oxidase/Xanthin-generierte Chemilumineszenz konnte durch  $40\ \mu\text{g/ml}$  SOD inhibiert werden. (B) Die Xanthin-Oxidase/Xanthin-vermittelte  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung konnte ebenfalls durch  $500\ \mu\text{M}$  Diphenyliodoniumchlorid gehemmt werden. Die Chemilumineszenz (CL) wurde in relativen Lichteinheiten (rLU)  $\cdot\ \text{sek}^{-1}$  angegeben.

Für die Bestimmung der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Generierung durch die NAD(P)H-Oxidase wurden die Endothelzellen an der Innenwand von Pyrex-Röhrchen kultiviert. Die Röhrchen konnten anschließend nach Stimulation mit ET-1 zur Quantifizierung der gebildeten  $\cdot\text{O}_2^-$  durch die Coelenterazin-vermittelte Chemilumineszenz direkt ins Chemiluminometer eingesetzt werden.

Die NAD(P)H-Oxidase-Aktivität wurde nach Inkubation mit 10 nM ET-1 im Vergleich zur Kontrolle induziert (max. Induktion nach 90 min:  $235 \pm 44$  rLU  $\cdot$  min<sup>-1</sup>  $\cdot$   $\mu$ g Protein<sup>-1</sup>; Kontrolle:  $170 \pm 27$  rLU  $\cdot$  min<sup>-1</sup>  $\cdot$   $\mu$ g Protein<sup>-1</sup>, n = 9, \*P < 0,05, siehe Abb. 3.6).



**Abb. 3.6:** Induktion der  $\cdot$ O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Bildung durch ET-1 in humanen Endothelzellen. Die HUVEC wurden mit 10 nM ET-1 für 90 min inkubiert. Die  $\cdot$ O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Bildung wurde durch die Coelenterazin-vermittelte Chemilumineszenz bestimmt (n = 9, \*P < 0,05 zu Kontrolle). Die Chemilumineszenz (CL) wurde in relativen Lichteinheiten (rLU)  $\cdot$  min<sup>-1</sup>  $\cdot$   $\mu$ g Protein<sup>-1</sup> angegeben.

Zusammenfassend konnte durch ET-1-Stimulation nach 1 h eine signifikante Induktion der essentiellen NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit gp91<sup>phox</sup> auf mRNA-Ebene in humanen Endothelzellen beobachtet werden. Die Induktion der gp91<sup>phox</sup>-mRNA-Expression wurde durch den ET<sub>B</sub>-Rezeptor vermittelt. Die NAD(P)H-Oxidase-Aktivität wurde durch ET-1 ebenfalls induziert.

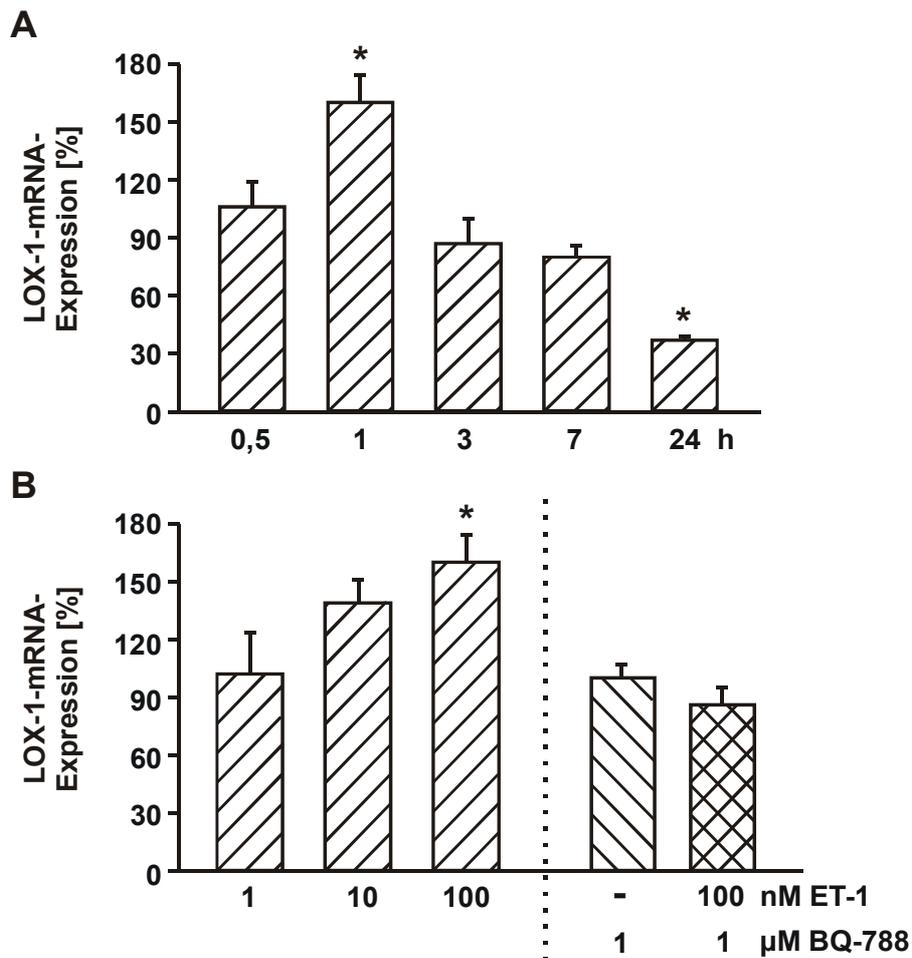
### 3.2.2 Regulation des oxLDL-Rezeptors LOX-1 durch ET-1

Der Einfluss von ET-1 wurde in weitergehenden Experimenten auf die Expression von LOX-1 untersucht. Dazu wurden Primärkulturen der HUVEC zeit- und konzentrationsabhängig mit ET-1 inkubiert. Aus diesen Kulturen wurde die RNA isoliert und die mRNA-Expression von LOX-1 durch standard-kalibrierte kompetitive RT-PCR quantifiziert.

Nach einstündiger Inkubation mit ET-1 (100 nM) konnte eine Induktion der mRNA-Expression von LOX-1 in humanen Endothelzellen nachgewiesen werden ( $160 \pm 14\%$

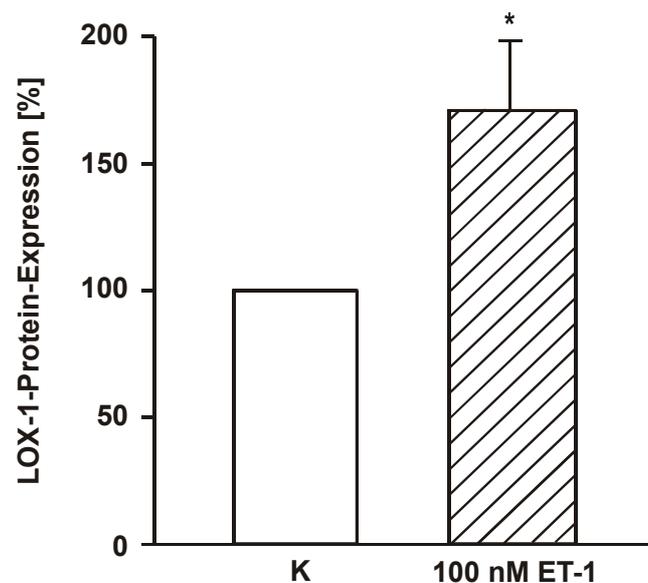
Kontrolle,  $n = 5$ ,  $P < 0,05$ ). Nach 3 h ET-1-Inkubation wurde das Kontrollniveau wieder erreicht. Die Induktion der mRNA-Expression von LOX-1 durch ET-1 ist konzentrationsabhängig. Die maximale Induktion wurde bei 100 nM ET-1 erreicht (siehe Abb. 3.7).

Die ET-1-induzierte mRNA-Expression von LOX-1 konnte ebenfalls durch 1  $\mu$ M BQ-788 verhindert werden ( $86 \pm 8\%$  zu Kontrolle,  $n = 4$ ). BQ-788 hatte keinen Einfluss auf die basale LOX-1-mRNA-Expression ( $100 \pm 7\%$  Kontrolle, siehe Abb. 3.7).



**Abb. 3.7:** (A) Zeitabhängige Regulation der mRNA-Expression von LOX-1 durch ET-1 in humanen Endothelzellen. Die HUVEC wurden mit 100 nM ET-1 für 0,5 - 24 h stimuliert ( $n \geq 3$ ,  $*P < 0,05$  zu Kontrolle). (B) Konzentrationsabhängige Regulation der mRNA-Expression von LOX-1 durch ET-1 und ET<sub>B</sub>-spezifische Hemmung der Induktion der LOX-1-Expression in humanen Endothelzellen. Die HUVEC wurden mit 1 - 100 nM ET-1, mit 1  $\mu$ M BQ-788 bzw. mit 100 nM ET-1 und 1  $\mu$ M BQ-788 für 1 h inkubiert. Die RNA wurde isoliert und die mRNA-Expression von LOX-1 durch standard-kalibrierte kompetitive RT-PCR quantifiziert (in % Kontrolle,  $n \geq 3$ ,  $*P < 0,05$  zu Kontrolle).

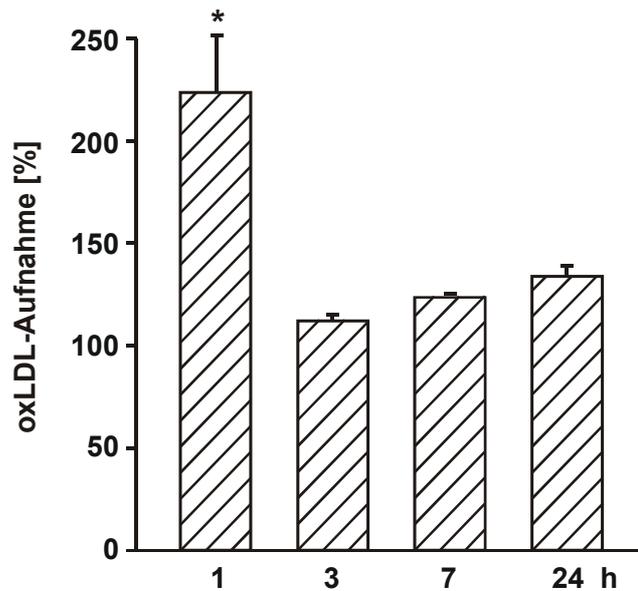
Anschließend wurde der Einfluss von ET-1 auf die Protein-Expression von LOX-1 untersucht. Die HUVEC wurden mit 100 nM ET-1 für 1 h inkubiert. Die Proteine wurden isoliert und die Protein-Expression von LOX-1 durch Western-Blot bestimmt. Dafür wurde ein LOX-1-spezifischer Antikörper von Herrn Prof. Dr. T. Sawamura (Universität Kyoto, Japan) verwendet. Nach einstündiger ET-1-Stimulation konnte eine signifikant erhöhte LOX-1-Protein-Expression nachgewiesen werden ( $171 \pm 21\%$  Kontrolle,  $n = 4$ ,  $P < 0,05$ , siehe Abb. 3.8).



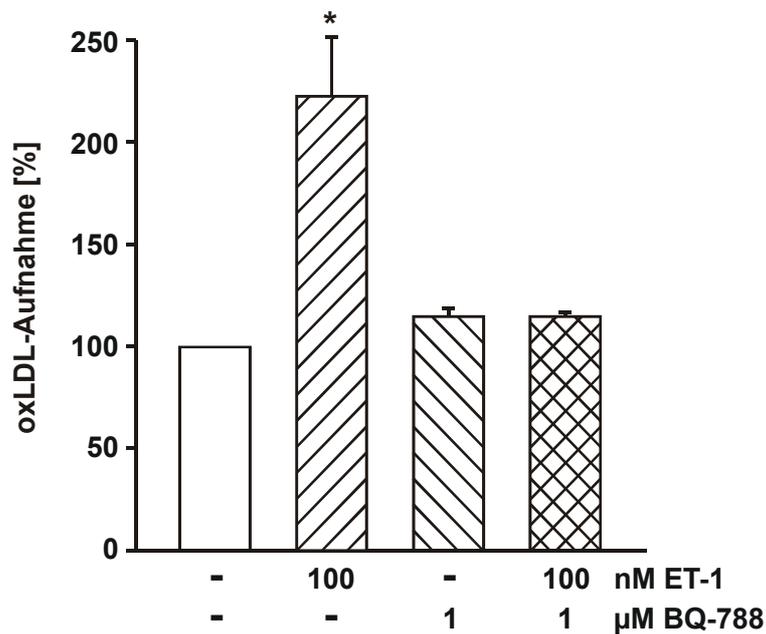
**Abb. 3.8:** Induktion der LOX-1-Protein-Expression durch ET-1 in humanen Endothelzellen. Die HUVEC wurden mit 100 nM ET-1 für 1 h inkubiert, die Proteine isoliert und die Protein-Expression von LOX-1 durch Western-Blot quantifiziert (in % Kontrolle,  $n = 4$ ,  $*P < 0,05$  zu Kontrolle).

In Zusammenarbeit mit Herrn B. Niemann (Martin-Luther-Universität Halle) wurden die Primärkulturen der HUVEC mit 100 nM ET-1 stimuliert und die Aufnahme von DiI-markiertem oxLDL quantifiziert. Nach einstündiger Stimulation mit 100 nM ET-1 konnte eine erhöhte oxLDL-Aufnahme in HUVEC nachgewiesen werden ( $223 \pm 29\%$  Kontrolle,  $n = 27$ ,  $P < 0,05$ , siehe Abb. 3.9).

Diese erhöhte oxLDL-Aufnahme war ebenfalls  $ET_B$ -Rezeptor-vermittelt ( $115 \pm 2\%$  Kontrolle,  $n = 18$ ). Dabei hatte BQ-788 (1  $\mu$ M) selbst keinen Einfluss auf die basale oxLDL-Aufnahme ( $115 \pm 4\%$  Kontrolle,  $n = 18$ , siehe Abb. 3.10).



**Abb. 3.9:** Effekt von ET-1 auf die oxLDL-Aufnahme in humanen Endothelzellen. Die HUVEC wurden mit 100 nM ET-1 für 1 - 24 h stimuliert. Die oxLDL-Aufnahme wurde mit DiI-markiertem oxLDL quantifiziert (in % Kontrolle,  $n \geq 9$ ,  $*P < 0,05$  zu Kontrolle).



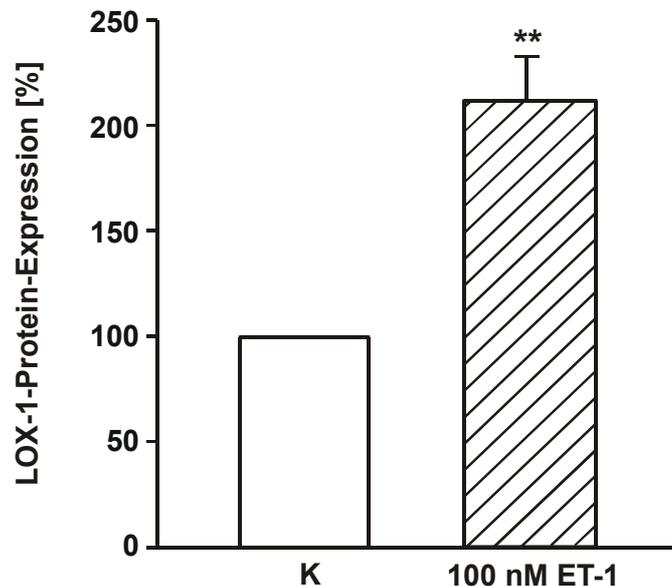
**Abb. 3.10:** Hemmung der ET-1 induzierten oxLDL-Aufnahme durch den  $ET_B$ -spezifischen Inhibitor BQ-788. Die HUVEC wurden mit 100 nM ET-1, mit 1  $\mu$ M BQ-788 bzw. mit 100 nM ET-1 und 1  $\mu$ M BQ-788 für 1 h inkubiert. Die oxLDL-Aufnahme wurde mit DiI-markiertem oxLDL quantifiziert (in % Kontrolle,  $n \geq 4$ ,  $*P < 0,05$  zu Kontrolle).

Zusammenfassend konnte durch ET-1-Stimulation nach 1 h eine signifikante Induktion von LOX-1 auf mRNA- und Proteinebene in humanen Endothelzellen nachgewiesen werden.

Zusätzlich wurde eine erhöhte Aufnahme von oxLDL gezeigt. Die Induktion der LOX-1-mRNA-Expression und der oxLDL-Aufnahme wird durch den ET<sub>B</sub>-Rezeptor vermittelt.

### 3.3 Einfluss von Ang II auf die Regulation von LOX-1

Ang II wird ebenfalls als pro-arteriosklerotischer Stimulus angesehen. Rueckschloss *et al.* konnten bereits eine Induktion der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit gp91<sup>phox</sup> durch Ang II-Stimulierung in HUVEC nachweisen (Rueckschloss *et al.*, 2002). Erste molekularbiologische und funktionelle Untersuchungen zur Regulation von LOX-1 zeigten nach 3 h eine erhöhte mRNA-Expression von LOX-1 und oxLDL-Aufnahme in Endothelzellen (Morawietz *et al.*, 1999). Innerhalb dieses Projektes wurde die LOX-1-Expression auf Proteinebene untersucht. Dazu wurden die Endothelzellen mit Ang II inkubiert, die Proteine isoliert und die Protein-Expression von LOX-1 durch Western-Blot-Analysen bestimmt. Nach 3 h Ang II-Stimulation (100 nM) konnte eine signifikant erhöhte LOX-1-Protein-Expression nachgewiesen werden (212 ± 21% Kontrolle, n = 6, P < 0,01, siehe Abb. 3.11).



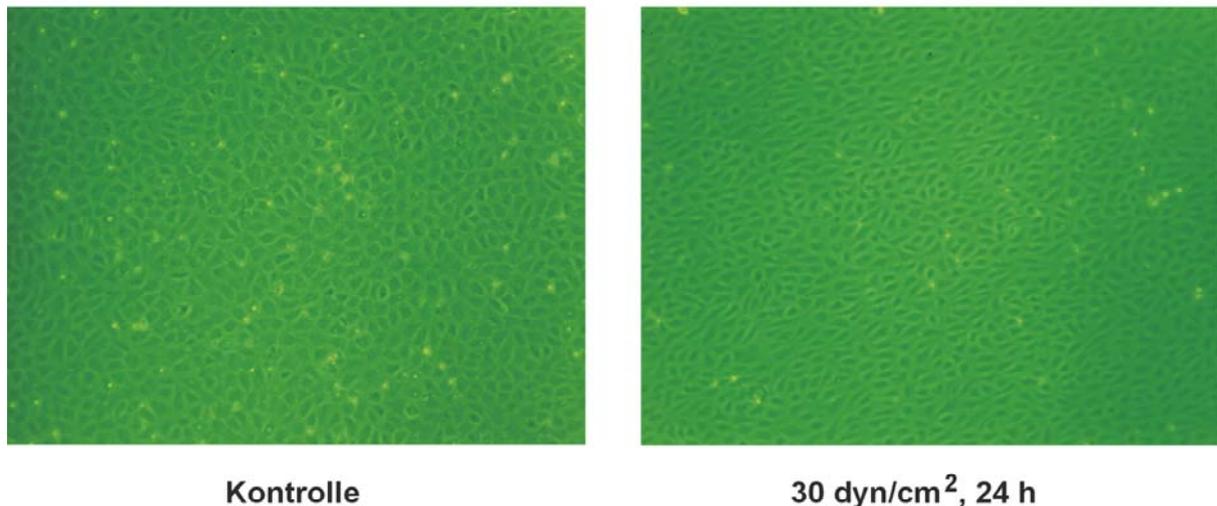
**Abb. 3.11:** Induktion der LOX-1-Protein-Expression durch Ang II in humanen Endothelzellen. Die HUVEC wurden mit 100 nM Ang II für 3 h inkubiert, die Proteine isoliert und die Protein-Expression von LOX-1 durch Western-Blot quantifiziert (in % Kontrolle, n = 6, \*P < 0,01 zu Kontrolle).

### 3.4 Einfluss von laminarer Schubspannung auf die Regulation der NAD(P)H-Oxidase und LOX-1

Gleichmäßige laminare Schubspannung wird als eine arterioprotektive Kraft angesehen. In diesem Teil der Arbeit sollte der Einfluss von laminarer Schubspannung auf die Regulation der NAD(P)H-Oxidase und LOX-1 analysiert werden.

#### 3.4.1 Regulation der endothelialen NAD(P)H-Oxidase durch Applikation von laminarer Schubspannung

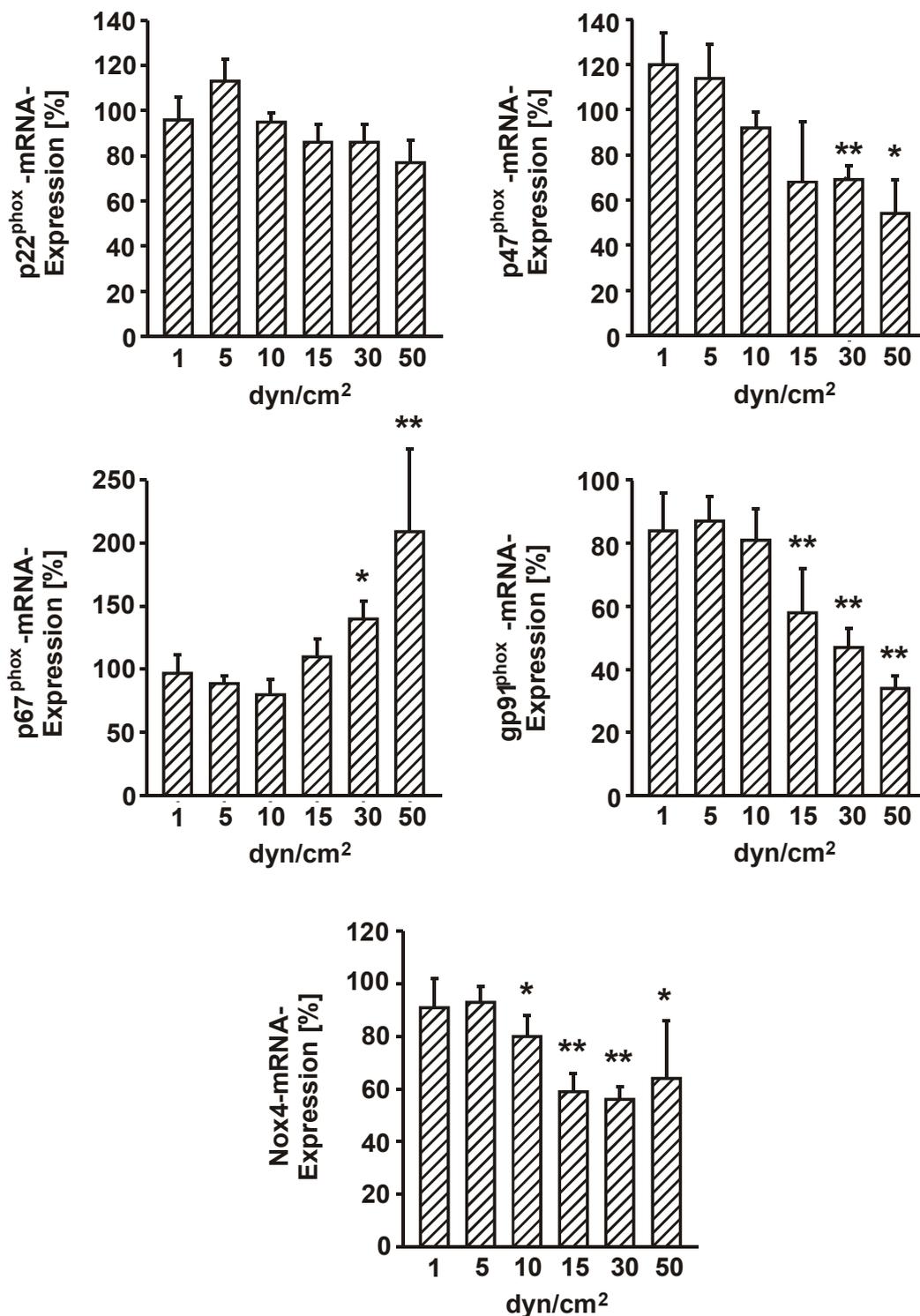
Für die Untersuchung der Regulation der NAD(P)H-Oxidase wurden die Endothelzellen in einem Plattenkegel-Viskosimeter einer laminaren Schubspannung bis zu  $50 \text{ dyn/cm}^2$  ausgesetzt. Nach 24 h konnten phänotypische Veränderungen der Schubspannung ausgesetzten HUVEC im Gegensatz zu den Kontrollzellen beobachtet werden. Die Endothelzellen richteten sich unter Schubspannung in Richtung der wirkenden Kraft aus. Dabei bildeten sie nach Applikation von laminarer Schubspannung einen spindelförmigen Phänotyp aus. Die stationär kultivierten Endothelzellen bildeten dagegen ein typisches „Kopfstein-Muster“ (*cobble stone*) (siehe Abb. 3.11).



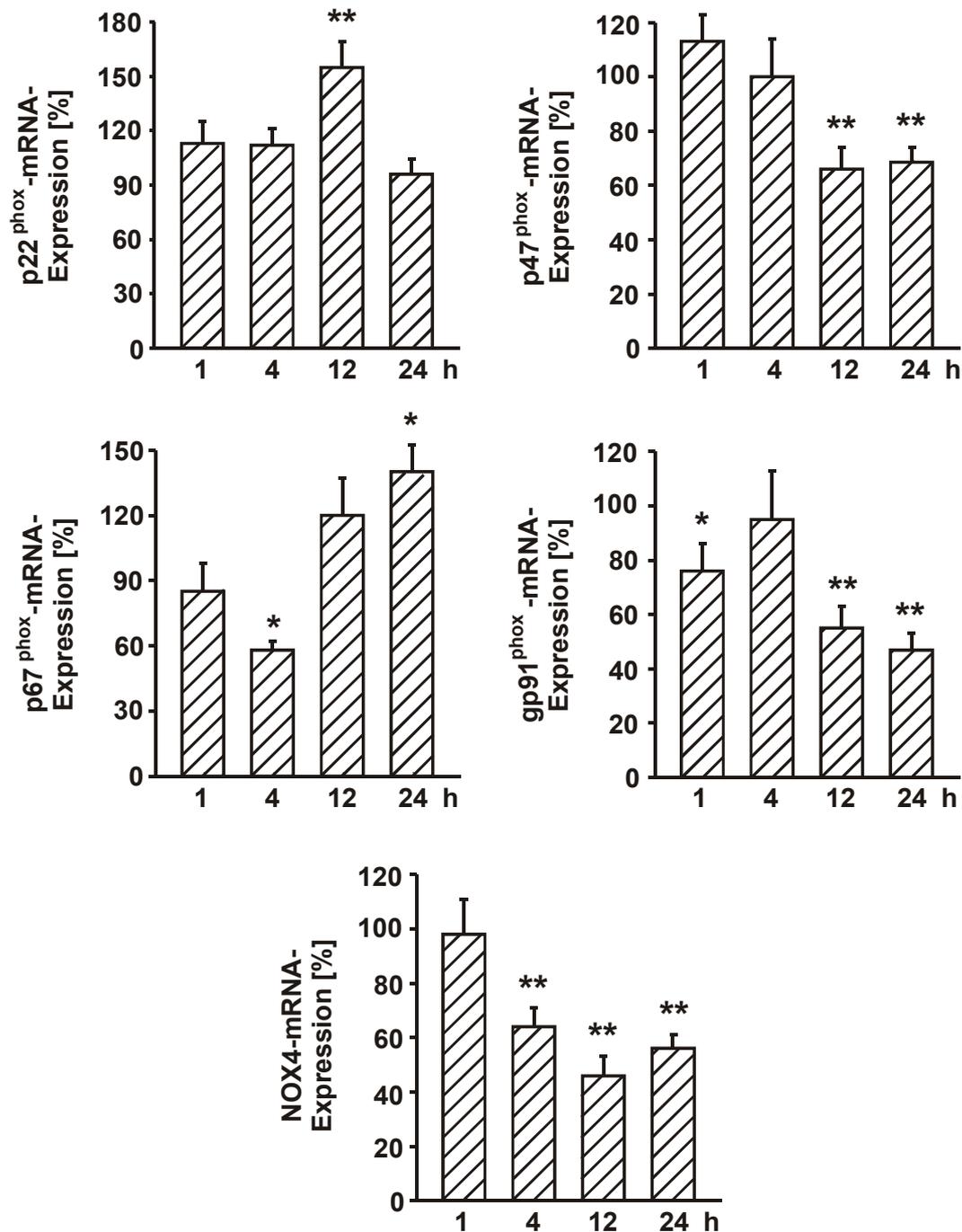
**Abb. 3.11:** Phänotypische Veränderung der humanen Endothelzellen durch Applikation von arterieller laminarer Schubspannung. Die HUVEC wurden 24 h in einem Plattenkegel-Viskosimeter einer Schubspannung von  $30 \text{ dyn/cm}^2$  ausgesetzt (rechts). Die stationäre Kontrolle ist im linken Bild dargestellt. 38fache Vergrößerung.

In den Endothelzellen wurde der Einfluss laminarer Schubspannung auf die mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, gp91<sup>phox</sup> und Nox4 untersucht. Dazu wurden die Primärkulturen der HUVEC zeit- und dosisabhängig in einem Plattenkegel-Viskosimeter mit Schubspannung behandelt. Aus diesen Kulturen wurde die RNA isoliert und die mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten durch standard-kalibrierte kompetitive bzw. semiquantitative RT-PCR quantifiziert.

Die mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten wurde zeit- und dosisabhängig reguliert. Die mRNA-Expression von p47<sup>phox</sup>, gp91<sup>phox</sup> und Nox4 wurden nach Applikation arterieller laminarer Schubspannung herabreguliert (siehe Abb. 3.12). Dabei wurde für gp91<sup>phox</sup> bereits nach 1 h eine Herabregulation der mRNA-Expression nachgewiesen ( $76 \pm 10\%$  Kontrolle,  $n = 5$ ,  $P < 0,05$ ). Langfristig (12 bzw. 24 h) war die mRNA-Expression der drei NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten herabreguliert (p47<sup>phox</sup>:  $66 \pm 8\%$  bzw.  $69 \pm 5\%$ , gp91<sup>phox</sup>:  $55 \pm 8\%$  bzw.  $47 \pm 6\%$ , Nox4:  $46 \pm 7\%$  bzw.  $58 \pm 5\%$  Kontrolle,  $n \geq 5$ ,  $P < 0,01$ ). Dagegen wurde die mRNA-Expression von p67<sup>phox</sup> nach Applikation einer Schubspannung von 30 bzw. 50 dyn/cm<sup>2</sup> nach 24 h induziert ( $140 \pm 14\%$  bzw.  $209 \pm 77\%$  Kontrolle,  $n \geq 3$ ,  $P < 0,05$  bzw.  $P < 0,01$ ). Eine Schubspannung von 30 dyn/cm<sup>2</sup> führte jedoch nach 4 h zu einer Herabregulation der p67<sup>phox</sup>-mRNA-Expression ( $58 \pm 4\%$  Kontrolle,  $n = 3$ ,  $P < 0,05$ ). Die mRNA-Expression von p22<sup>phox</sup> wurde durch eine Schubspannung von 30 dyn/cm<sup>2</sup> nach 12 h induziert ( $155 \pm 14\%$  Kontrolle,  $n = 5$ ,  $P < 0,01$ ), nach 24 h war jedoch keine Regulation der p22<sup>phox</sup>-mRNA-Expression erkennbar (siehe Abb. 3.13).



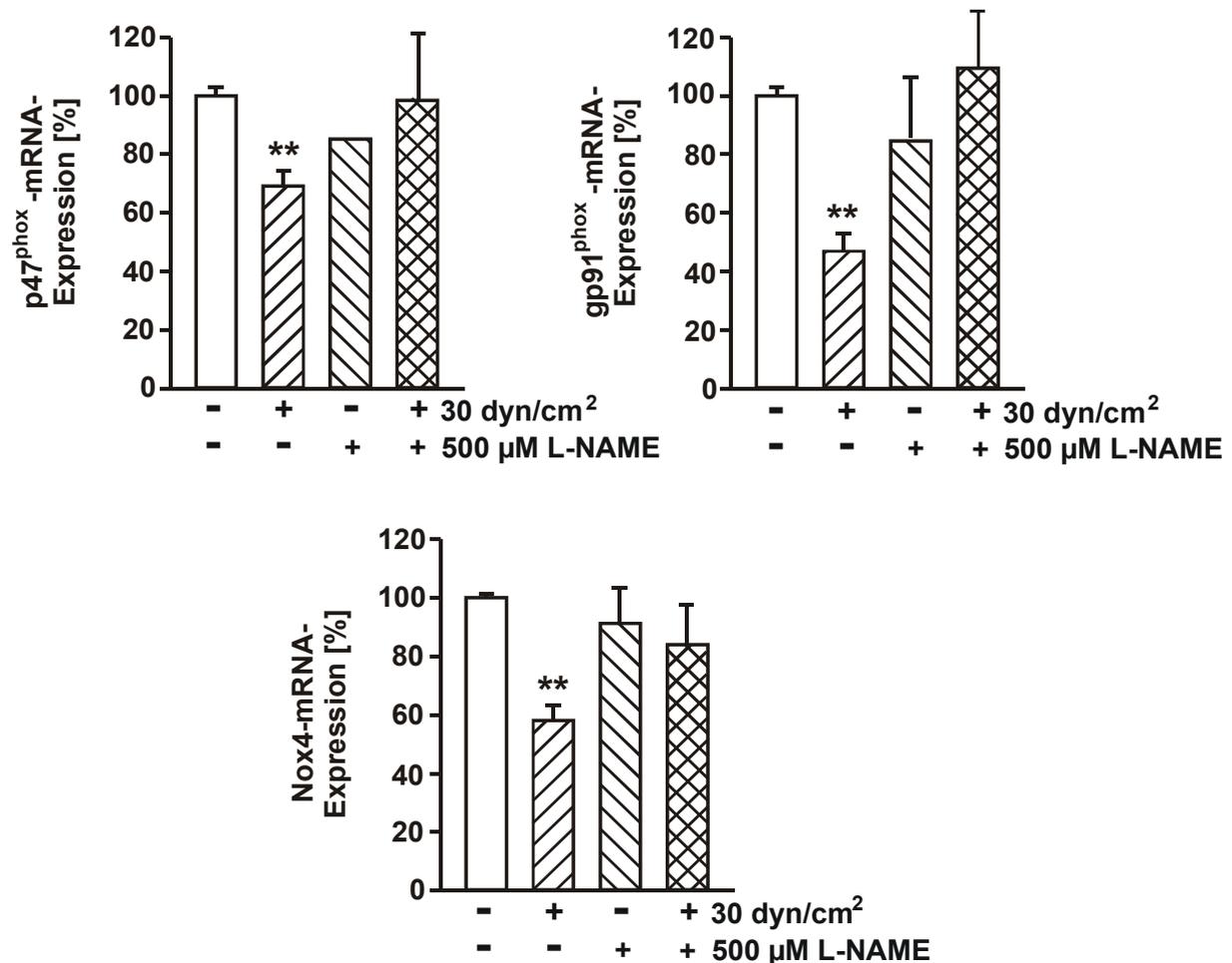
**Abb. 3.12:** Schubspannungsabhängige Regulation der mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, gp91<sup>phox</sup> und Nox4 in humanen Endothelzellen. Die HUVEC wurden Schubspannungen von 1 - 50 dyn/cm<sup>2</sup> für 24 h ausgesetzt. Die RNA wurde isoliert und die mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten durch standard-kalibrierte kompetitive bzw. semiquantitative RT-PCR quantifiziert (in % Kontrolle, n ≥ 5, \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 zu Kontrolle).



**Abb. 3.13:** Zeitabhängige Regulation der mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, gp91<sup>phox</sup> und NOX4 durch laminare Schubspannung in humanen Endothelzellen. Die HUVEC wurden einer Schubspannung von 30 dyn/cm<sup>2</sup> bis zu 24 h ausgesetzt. Die RNA wurde isoliert und die mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten durch standard-kalibrierte kompetitive bzw. semiquantitative RT-PCR quantifiziert (in % Kontrolle, n ≥ 3, \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 zu Kontrolle).

·NO kann als Signalmolekül die Expression von Genen regulieren. Deshalb wurde in weiteren Experimenten der Einfluss von ·NO bei der Herabregulation der mRNA-Expression untersucht. Dafür wurden die HUVEC mit L-NAME, einem spezifischen Inhibitor der ·NO-Synthase,

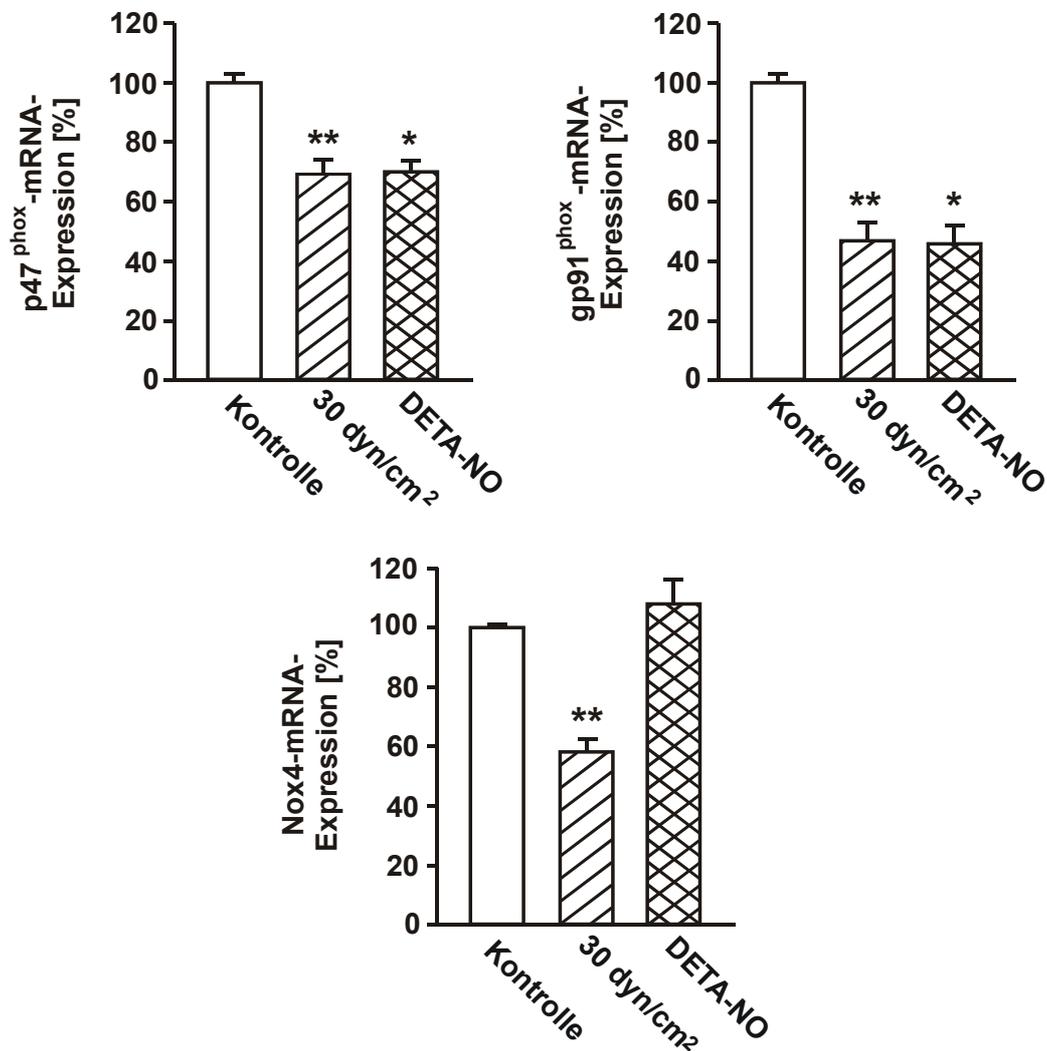
während der Applikation von Schubspannung inkubiert. 500  $\mu\text{M}$  L-NAME verhinderte die Herabregulation der mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten p47<sup>phox</sup>, gp91<sup>phox</sup> und Nox4 (p47<sup>phox</sup>:  $99 \pm 22\%$ , gp91<sup>phox</sup>:  $109 \pm 20\%$ , Nox4:  $84 \pm 13\%$  Kontrolle,  $n \geq 4$ ). L-NAME zeigte selbst keinen Einfluss auf die basale mRNA-Expression dieser NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten (siehe Abb. 3.14).



**Abb. 3.14:** Einfluss des  $\cdot\text{NO}$ -Synthase-spezifischen Inhibitors L-NAME auf die mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten p47<sup>phox</sup>, gp91<sup>phox</sup> und Nox4. Die HUVEC wurden einer Schubspannung von  $30 \text{ dyn/cm}^2$  für 24 h mit bzw. ohne L-NAME ( $500 \mu\text{M}$ ) ausgesetzt. Die RNA wurde isoliert und die mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten durch standard-kalibrierte kompetitive bzw. semiquantitative RT-PCR quantifiziert (in % Kontrolle,  $n \geq 4$ , \*\* $P < 0,01$  zu Kontrolle).

Zur Bestätigung der Regulation der mRNA-Expression durch  $\cdot\text{NO}$  wurden stationäre HUVEC mit dem  $\cdot\text{NO}$ -Donor DETA-NO ( $500 \mu\text{M}$ ) inkubiert. Die mRNA-Expression von p47<sup>phox</sup> und gp91<sup>phox</sup> wurde durch das DETA-NO-generierte  $\cdot\text{NO}$  signifikant herabreguliert (p47<sup>phox</sup>:  $70 \pm$

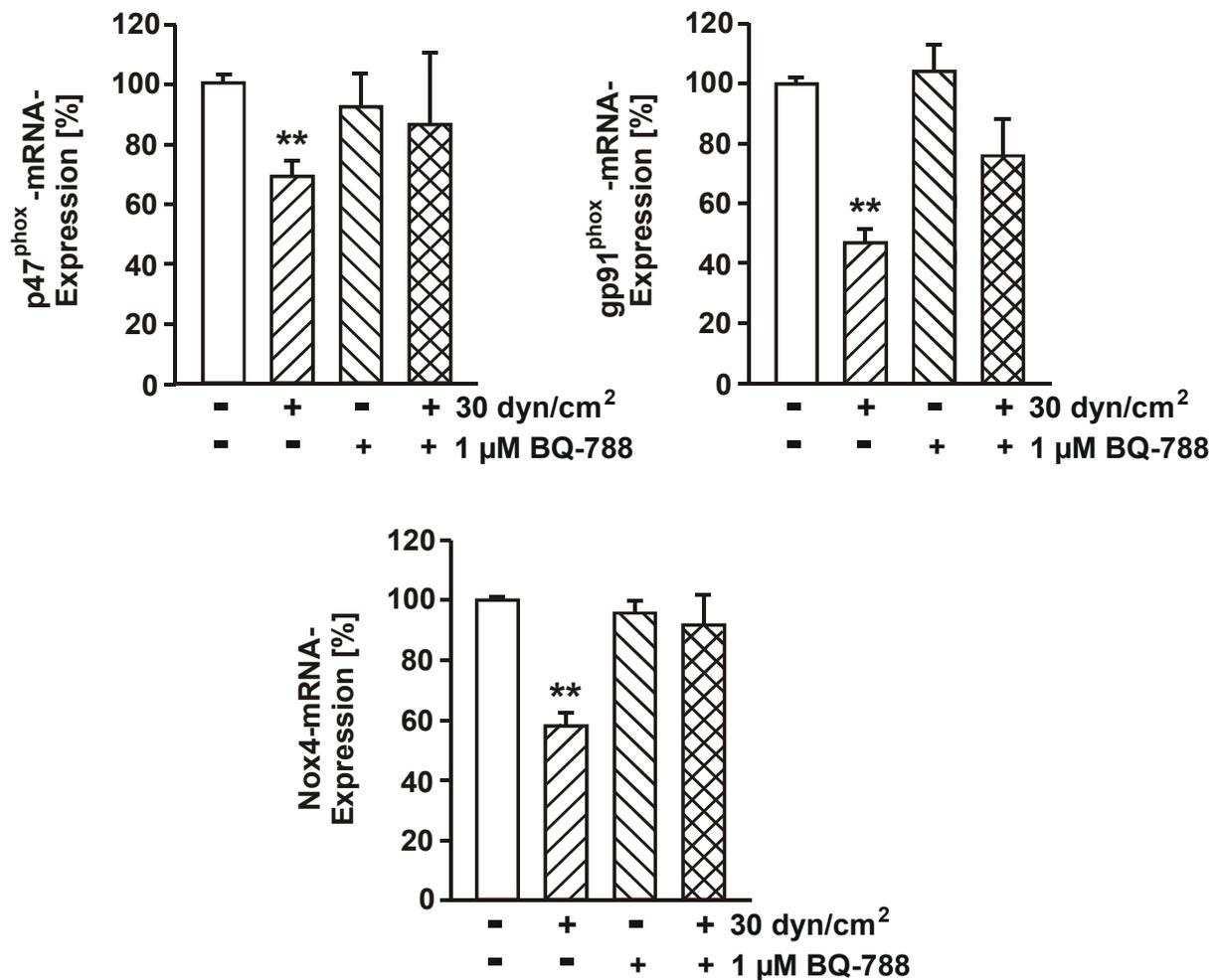
4%, gp91<sup>phox</sup>:  $46 \pm 6\%$  Kontrolle,  $n \geq 5$ ,  $P < 0,05$ ). Die mRNA-Expression von Nox4 wurde dagegen nicht durch DETA-NO beeinflusst ( $108 \pm 8\%$ ,  $n = 6$ , siehe Abb. 3.15).



**Abb. 3.15:** Einfluss von ·NO-Freisetzung auf die mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten p47<sup>phox</sup>, gp91<sup>phox</sup> und Nox4. Die HUVEC wurden 24 h einer Schubspannung von 30 dyn/cm<sup>2</sup> ausgesetzt bzw. mit DETA-NO (500 μM) inkubiert. Die RNA wurde isoliert und die mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten durch standard-kalibrierte kompetitive bzw. semiquantitative RT-PCR quantifiziert (in % Kontrolle,  $n \geq 5$ , \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  zu Kontrolle).

Chronische laminare Schubspannung verringert die ET-1-Bildung (Sharefkin *et al.*, 1991; Malek & Izumo, 1992; Morawietz *et al.*, 2000). Die vasokonstriktiv wirkenden Substanzen ET-1 und Ang II können sich wechselseitig stimulieren (Dohi *et al.*, 1992; Rossi *et al.*, 1999). Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass ET-1 (siehe 3.2.1; Duerrschmidt *et al.*, 2000) und Ang II (Rueckschloss *et al.*, 2002) die NAD(P)H-Oxidase Untereinheit gp91<sup>phox</sup> induzieren.

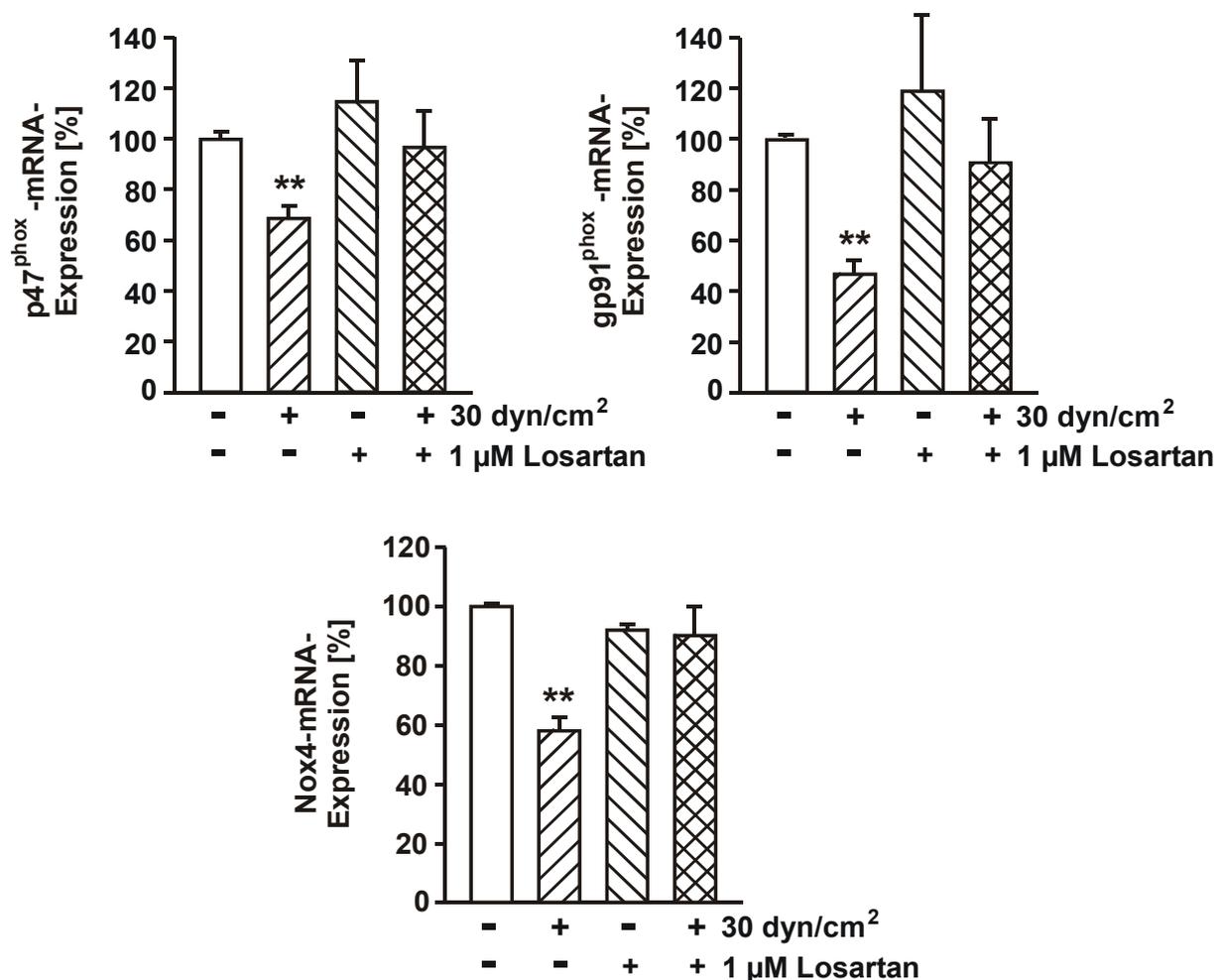
Daher wurde in weiteren Experimenten der Einfluss von ET-1 und Ang II auf die Regulation der NAD(P)H-Oxidase durch Schubspannung untersucht.



**Abb. 3.16:** Einfluss des ET<sub>B</sub>-Rezeptor-spezifischen Inhibitors BQ-788 auf die mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten p47<sup>phox</sup>, gp91<sup>phox</sup> und Nox4. Die HUVEC wurden einer Schubspannung von 30 dyn/cm<sup>2</sup> für 24 h mit bzw. ohne BQ-788 (1 μM) ausgesetzt. Die RNA wurde isoliert und die mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten durch standard-kalibrierte kompetitive bzw. semiquantitative RT-PCR quantifiziert (in % Kontrolle, n ≥ 4, \*\*P < 0,01 zu Kontrolle).

Die HUVEC wurden mit spezifischen Inhibitoren (1 μM BQ-788 bzw. 1 μM Losartan) des ET-1- bzw. Ang II-spezifischen Rezeptors (ET<sub>B</sub>- bzw. AT<sub>1</sub>-Rezeptor) während der Applikation von Schubspannung inkubiert. Die Herabregulation der mRNA-Expression von p47<sup>phox</sup>, gp91<sup>phox</sup> und Nox4 wird sowohl durch den ET<sub>B</sub>-Rezeptor, als auch durch den AT<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelt. Die Inhibitoren BQ-788 bzw. Losartan verhinderten die Herabregulation der mRNA (p47<sup>phox</sup>: 86 ± 24%, gp91<sup>phox</sup>: 76 ± 12%, Nox4: 91 ± 10% Kontrolle, n = 6 bzw. p47<sup>phox</sup>: 97 ± 14%, gp91<sup>phox</sup>: 91 ± 17%, Nox4: 90 ± 10% Kontrolle, n = 4). Die Inhibitoren

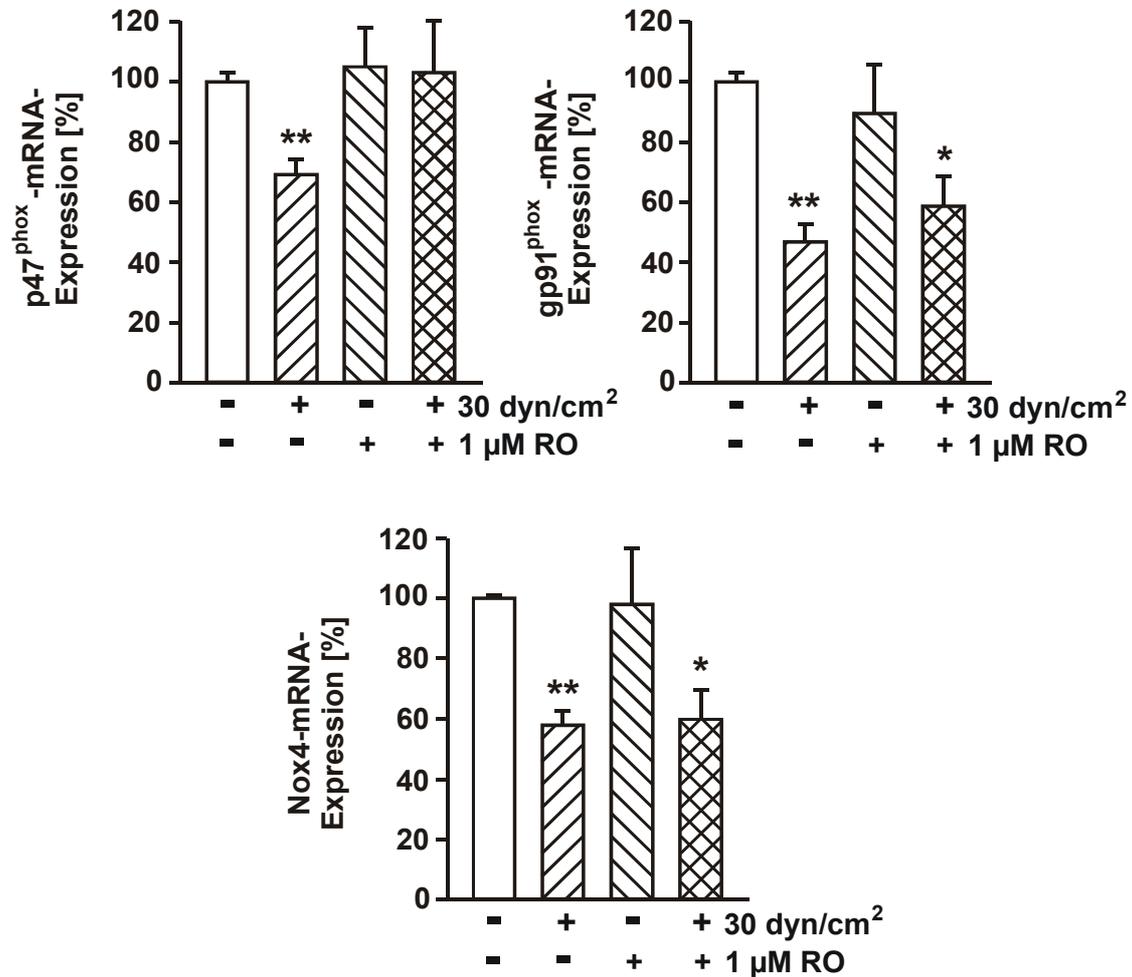
hatten keinen Einfluss auf die basale mRNA-Expression von  $p47^{\text{phox}}$ ,  $gp91^{\text{phox}}$  und Nox4, siehe Abb. 3.16 bzw. 3.17).



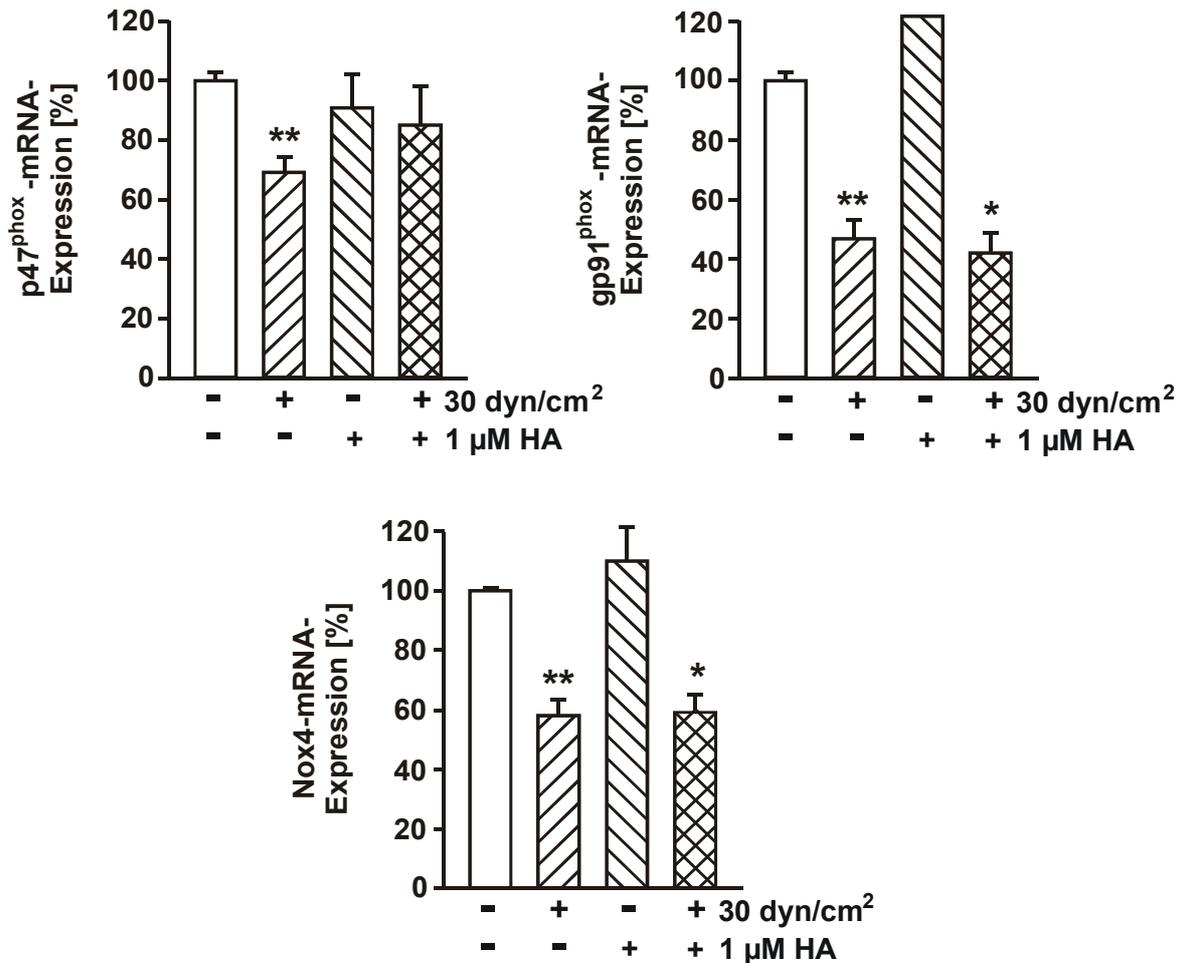
**Abb. 3.17:** Einfluss des  $AT_1$ -Rezeptor-spezifischen Inhibitors Losartan auf die mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten  $p47^{\text{phox}}$ ,  $gp91^{\text{phox}}$  und Nox4. Die HUVEC wurden einer Schubspannung von  $30 \text{ dyn/cm}^2$  für 24 h mit bzw. ohne Losartan ( $1 \mu\text{M}$ ) ausgesetzt. Die RNA wurde isoliert und die mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten durch standard-kalibrierte kompetitive bzw. semiquantitative RT-PCR quantifiziert (in % Kontrolle,  $n \geq 4$ ,  $**P < 0,01$  zu Kontrolle).

Anschließend wurde die Rolle von Proteinkinasen analysiert, die das Signal in den Zellkern weiterleiten könnten. Hierbei wurden die HUVEC mit spezifischen Inhibitoren der PKC (RO-31-8220) bzw. der Tyrosinkinasen (Herbimycin A) während der Applikation von Schubspannung inkubiert. Die Herabregulation der mRNA-Expression von  $p47^{\text{phox}}$  wird über die PKC bzw. Tyrosinkinasen vermittelt, da der Inhibitor RO-31-8220 bzw. Herbimycin A die Herabregulation der mRNA-Expression verhindern konnte ( $103 \pm 17\%$  bzw.  $85 \pm 13\%$  Kontrolle,  $n \geq 5$ ). Dagegen hatten RO-31-8220 bzw. Herbimycin A keinen Einfluss auf die

mRNA-Expression von gp91<sup>phox</sup> und Nox4 (gp91<sup>phox</sup>:  $59 \pm 10\%$  bzw.  $42 \pm 7\%$ , Nox4:  $60 \pm 10\%$  bzw.  $59 \pm 6\%$  Kontrolle,  $n \geq 7$ ,  $P < 0,05$ ). Auf die basale mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten hatten die Inhibitoren keinen Effekt (siehe Abb. 3.18 bzw. 3.19).



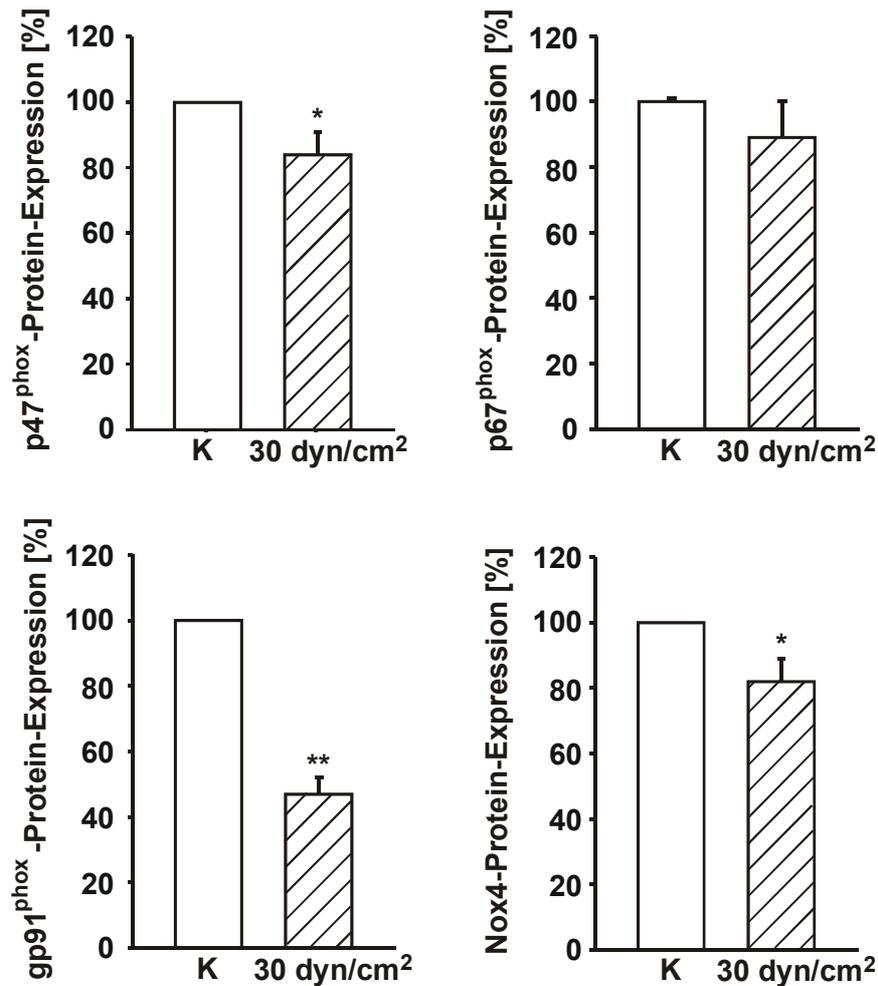
**Abb. 3.18:** Einfluss des PKC-spezifischen Inhibitors RO-31-8220 auf die mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten p47<sup>phox</sup>, gp91<sup>phox</sup> und Nox4. Die HUVEC wurden einer Schubspannung von 30 dyn/cm<sup>2</sup> für 24 h mit bzw. ohne RO-31-8220 (RO; 1 μM) ausgesetzt. Die RNA wurde isoliert und die mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten durch standardkalibrierte kompetitive bzw. semiquantitative RT-PCR quantifiziert (in % Kontrolle,  $n \geq 7$ , \* $P < 0,05$  bzw. \*\* $P < 0,01$  zu Kontrolle).



**Abb. 3.19:** Einfluss des Tyrosinkinases-Inhibitors Herbimycin A auf die mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten p47<sup>phox</sup>, gp91<sup>phox</sup> und Nox4. Die HUVEC wurden einer Schubspannung von 30 dyn/cm<sup>2</sup> für 24 h mit bzw. ohne Herbimycin A (HA; 1 μM) ausgesetzt. Die RNA wurde isoliert und die mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten durch standard-kalibrierte kompetitive bzw. semiquantitative RT-PCR quantifiziert (in % Kontrolle, n ≥ 5, \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 zu Kontrolle).

In weiterführenden Experimenten wurde der Einfluss von Schubspannung auf die Regulation der Protein-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten untersucht. Dabei wurden HUVEC einer Schubspannung von 30 dyn/cm<sup>2</sup> für 24 h ausgesetzt und anschließend die Proteine isoliert. Die Protein-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, gp91<sup>phox</sup> und Nox4 wurde durch Western-Blot-Analysen bestimmt. Für p22<sup>phox</sup> war kein spezifischer Antikörper für die Bestimmung der Protein-Expression verfügbar.

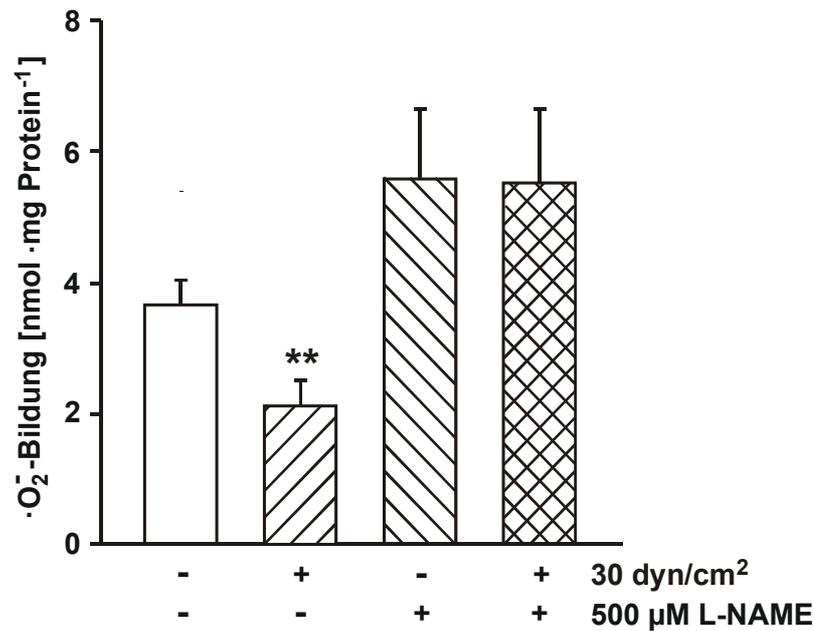
Die Protein-Expression von p47<sup>phox</sup>, gp91<sup>phox</sup> und Nox4 wurde durch Applikation von Schubspannung (30 dyn/cm<sup>2</sup>, 24 h) herabreguliert (p47<sup>phox</sup>: 84 ± 7%, gp91<sup>phox</sup>: 47 ± 7%, Nox4: 82 ± 7% Kontrolle, n ≥ 5, P < 0,05). Dagegen wurde die Protein-Expression von p67<sup>phox</sup> nicht reguliert (89 ± 11% Kontrolle, n = 14, siehe Abb. 3.20).



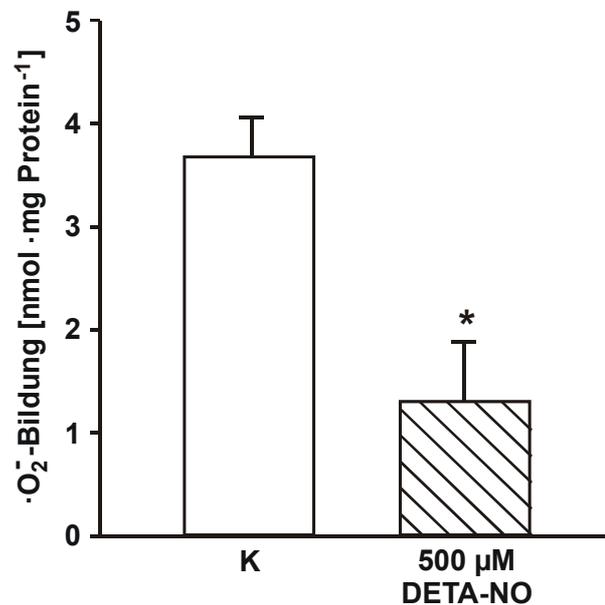
**Abb. 3.20:** Regulation der Protein-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, gp91<sup>phox</sup> und Nox4 durch laminare Schubspannung in humanen Endothelzellen. Die HUVEC wurden einer Schubspannung von 30 dyn/cm<sup>2</sup> für 24 h ausgesetzt, die Proteine isoliert und die Protein-Expression durch Western-Blot-Analysen quantifiziert (in % Kontrolle, n ≥ 5, \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 zu Kontrolle).

Um die Expressionsdaten auch auf funktioneller Ebene zu überprüfen, wurde der Einfluss laminaren Schubspannung auf die Generierung von  $\cdot\text{O}_2^-$  untersucht. Dabei wurden HUVEC einer Schubspannung von 30 dyn/cm<sup>2</sup> für 24 h ausgesetzt und anschließend die  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung durch die Cytochrom c-Nachweismethode bestimmt.

Laminare Schubspannung von 30 dyn/cm<sup>2</sup> für 24 h bewirkte eine signifikante Herabregulation der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung in humanen Endothelzellen ( $2,1 \pm 0,4$  nmol · mg Protein<sup>-1</sup>, Kontrolle:  $3,7 \pm 0,4$  nmol · mg Protein<sup>-1</sup>, n = 8, P < 0,01). Die Herabregulation konnte durch die Zugabe von 500 μM L-NAME wieder verhindert werden ( $5,5 \pm 1,3$  nmol · mg Protein<sup>-1</sup>, n = 4, siehe Abb. 3.21).



**Abb. 3.21:** Herabregulation der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung durch laminare Schubspannung und Einfluss des  $\cdot\text{NO}$ -Synthase-spezifischen Inhibitors L-NAME auf die  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung in humanen Endothelzellen. Die HUVEC wurden einer Schubspannung von 30 dyn/cm<sup>2</sup> für 24 h mit bzw. ohne L-NAME (500 μM) ausgesetzt. Die  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung wurde durch die Cytochrom c-Methode bestimmt und in nmol · mg Protein<sup>-1</sup> angegeben (n = 7, \*P < 0,05 zu Kontrolle).



**Abb. 3.22:** Herabregulation der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung durch DETA-NO in humanen Endothelzellen. Die HUVEC wurden mit 500 μM DETA-NO für 24 h inkubiert. Die  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung wurde durch die Cytochrom c-Methode bestimmt und in nmol · mg Protein<sup>-1</sup> angegeben (n = 4, \*P < 0,05 zu Kontrolle).

Der ·NO-Donor DETA-NO verringerte in gleichem Umfang wie die arterielle laminare Schubspannung die mRNA-Expression von p47<sup>phox</sup> und gp91<sup>phox</sup>. Deshalb wurde in weiteren Experimenten die ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Bildung von stationären Endothelzellen nach Zugabe von DETA-NO (500 µM) bestimmt. Nach 24 h konnte ebenfalls eine signifikante Herabregulation der Generierung von ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> nachgewiesen werden ( $1,3 \pm 0,6 \text{ nmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$ , Kontrolle:  $3,7 \pm 0,4 \text{ nmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$ , n = 4, P < 0,05, siehe Abb. 3.22).

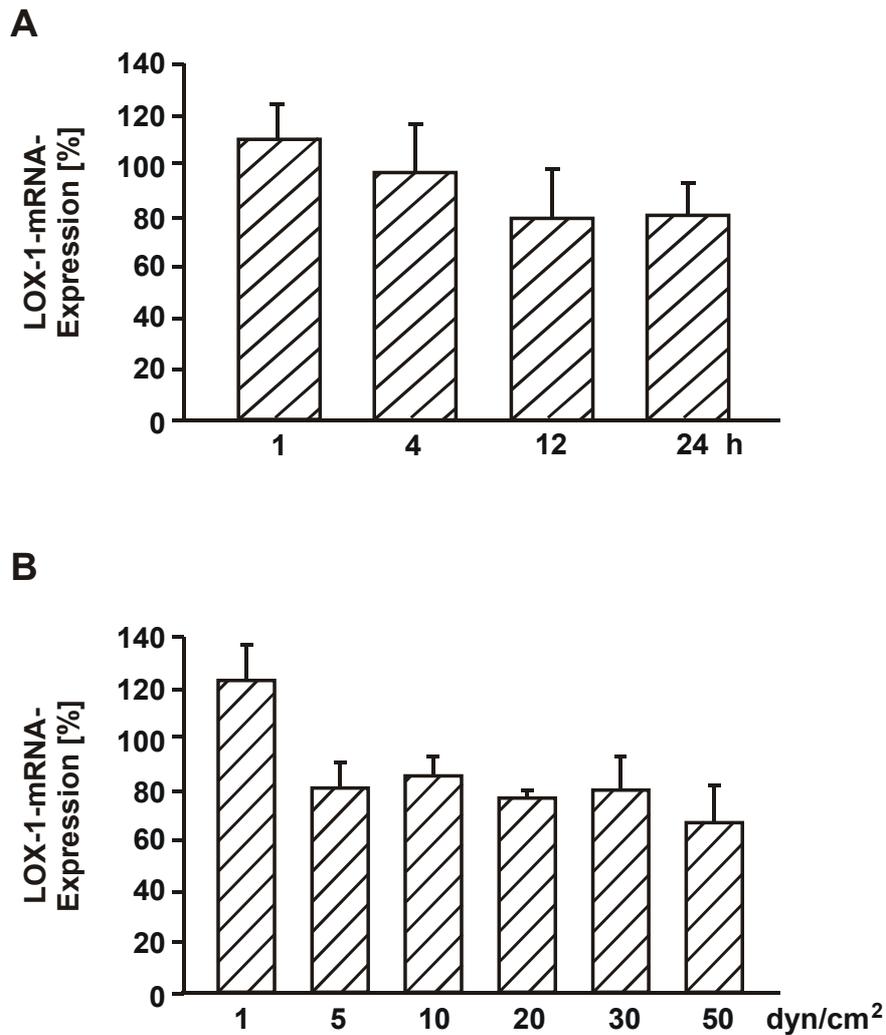
Zusammenfassend konnte durch Applikation von arterieller laminarer Schubspannung von 30 dyn/cm<sup>2</sup> für 24 h eine signifikante Herabregulation der mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten p47<sup>phox</sup>, gp91<sup>phox</sup> und Nox4 beobachtet werden. Die Protein-Expression dieser Untereinheiten war ebenfalls herabreguliert. Darüber hinaus konnte eine verringerte ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Bildung der Endothelzellen gezeigt werden.

Die Herabregulation der mRNA-Expression von p47<sup>phox</sup>, gp91<sup>phox</sup> und Nox4 durch arterielle laminare Schubspannung konnte durch Blockade des ET<sub>B</sub>- bzw. AT<sub>1</sub>-Rezeptors gehemmt werden. Zusätzlich konnte die Herabregulation der mRNA-Expression dieser NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten und der ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Bildung durch die Hemmung der eNOS aufgehoben werden. Die Inkubation von stationären HUVEC mit DETA-NO vermittelte eine Herabregulation der mRNA-Expression von p47<sup>phox</sup> und gp91<sup>phox</sup> sowie eine verminderte ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Bildung der Endothelzellen. Die schubspannungsabhängige mRNA-Regulation von p47<sup>phox</sup> wird zusätzlich durch PKC und Tyrosinkinasen vermittelt.

### **3.4.2 Regulation des oxLDL-Rezeptors LOX-1 durch Applikation von laminarer Schubspannung**

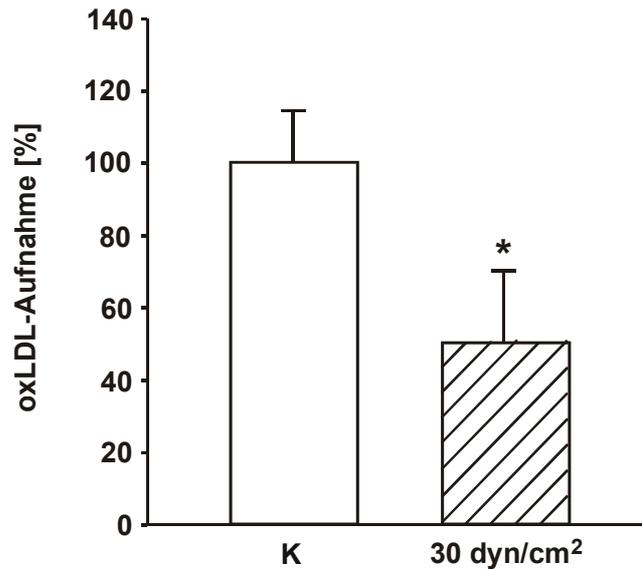
In diesem Teil der Arbeit sollte der Einfluss von laminarer Schubspannung auf die Regulation des oxLDL-Rezeptors LOX-1 untersucht werden. Dazu wurden HUVEC in einem Plattenkegel-Viskosimeter laminarer Schubspannung von 30 dyn/cm<sup>2</sup> für 24 h ausgesetzt. Die RNA wurde anschließend isoliert und die mRNA-Expression von LOX-1 durch standardkalibrierte kompetitive RT-PCR quantifiziert.

Die mRNA-Expression von LOX-1 zeigte nach Applikation laminarer Schubspannung eine zeit- bzw. dosisabhängig tendenzielle Herabregulation, die jedoch kein Signifikanzniveau erreichte (siehe Abb. 3.23).



**Abb. 3.23:** (A) Zeitabhängige Regulation der mRNA-Expression von LOX-1 durch laminare Schubspannung in humanen Endothelzellen. Die HUVEC wurden einer Schubspannung von 30 dyn/cm<sup>2</sup> für 1 - 24 h ausgesetzt (n ≥ 5). (B) Schubspannungsabhängige Regulation der LOX-1-mRNA-Expression in humanen Endothelzellen. Die HUVEC wurden einer Schubspannung von 1 - 50 dyn/cm<sup>2</sup> für 24 h ausgesetzt. Die RNA wurde isoliert und die mRNA-Expression von LOX-1 durch standard-kalibrierte kompetitive RT-PCR quantifiziert (in % Kontrolle, n ≥ 3).

Diese tendenzielle Herabregulation der mRNA-Expression von LOX-1 wurde auf funktioneller Ebene überprüft. Dazu wurden die Primärkulturen der HUVEC einer Schubspannung von 30 dyn/cm<sup>2</sup> ausgesetzt und die oxLDL-Aufnahme mit Hilfe von DiI-markiertem oxLDL quantifiziert. Nach 24 h konnte eine signifikant reduzierte oxLDL-Aufnahme nachgewiesen werden (51 ± 20% Kontrolle, n = 4, P < 0,05, siehe Abb. 3.24).



**Abb. 3.24:** Einfluss von laminarer Schubspannung auf die oxLDL-Aufnahme in humanen Endothelzellen. Die HUVEC wurden 24 h einer Schubspannung von 30 dyn/cm<sup>2</sup> ausgesetzt und die oxLDL-Aufnahme mit DiI-markiertem oxLDL (50 µg/ml) quantifiziert (in % Kontrolle, n = 4, \*P < 0.05).

Zusammenfassend konnte nach Applikation von laminarer Schubspannung (30 dyn/cm<sup>2</sup>, 24 h) eine signifikante Herabregulation der oxLDL-Aufnahme in humanen Endothelzellen nachgewiesen werden. Die Expression der LOX-1-mRNA war tendenziell herabreguliert, ohne das Signifikanzniveau zu erreichen.

### 3.5 Expression von Nox4 im humanen Myokard

Über die Expression der gp91<sup>phox</sup>-homologen Untereinheit Nox4 im Myokard liegen bisher noch keine Angaben vor. Daher wurde die Expression von Nox4 im humanen Myokard des linken Ventrikel analysiert. Sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene konnte Nox4 auch im Myokard nachgewiesen werden. Daher wurde in weitergehenden Untersuchungen neben den NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> und gp91<sup>phox</sup> auch die Regulation von Nox4 im Myokard des linken Ventrikels analysiert.

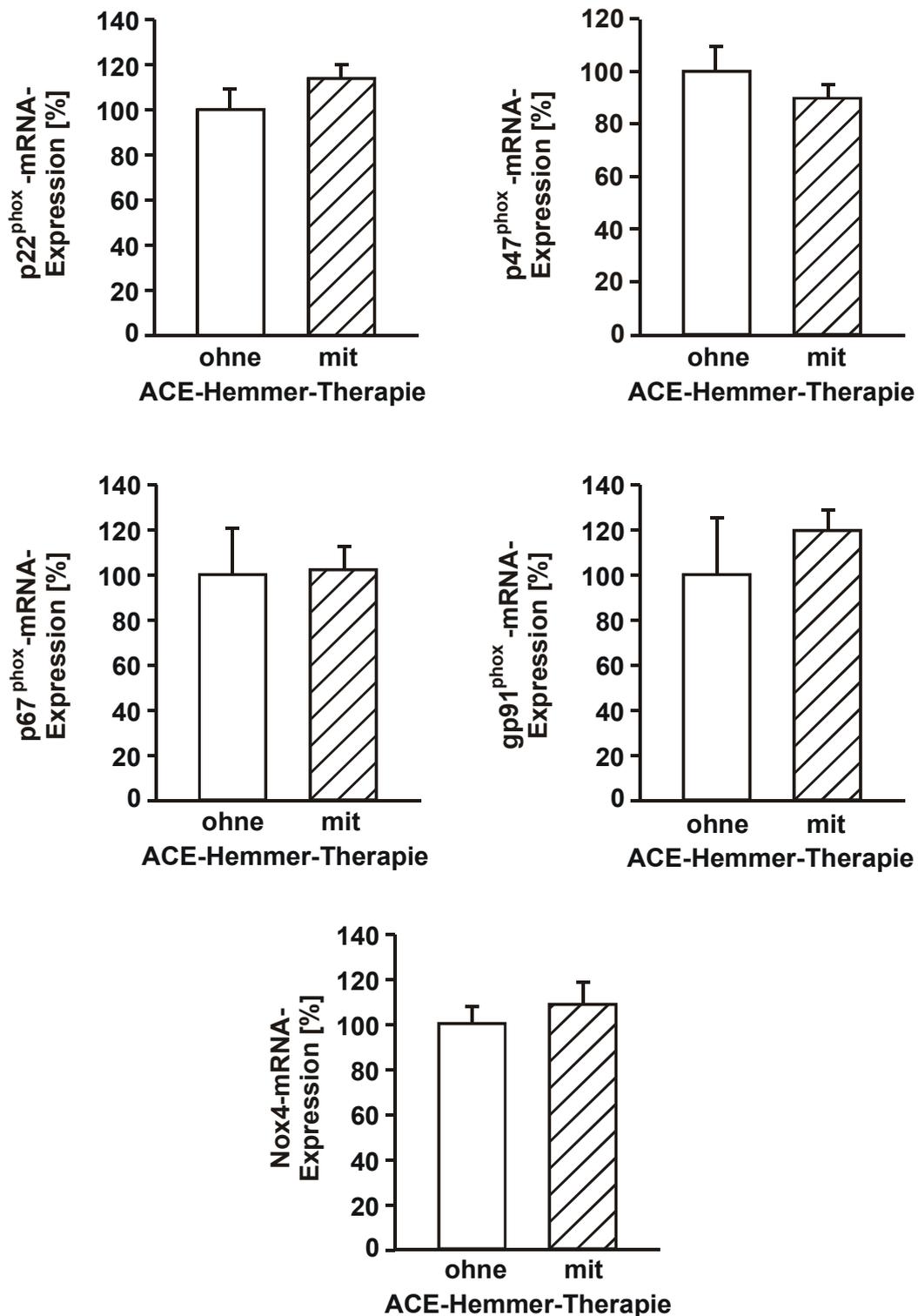
### 3.6 Einfluss von ACE-Hemmer-Therapie auf die NAD(P)H-Oxidase im linken Ventrikel von Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz

ACE-Hemmer werden als Standardtherapie bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz eingesetzt. Da bekannt ist, dass Ang II die Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten *in vitro* stimuliert (Rueckschloss *et al.*, 2002), wurde im letzten Teil der Arbeit die mRNA-

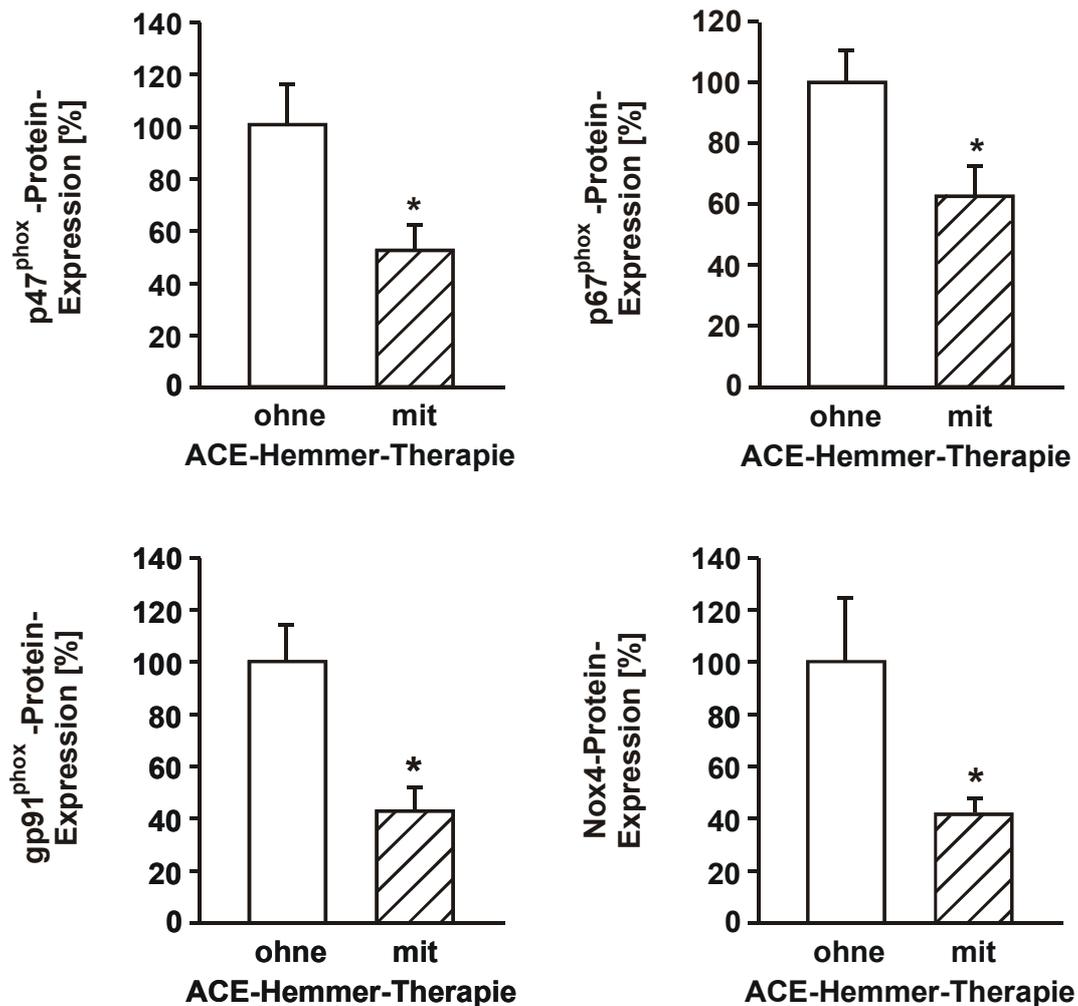
bzw. die Protein-Expression von gp91<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup> und Nox4 im linken Ventrikel von herzinsuffizienten Patienten mit bzw. ohne ACE-Hemmer-Therapie untersucht. Dazu wurden Patientenkollektive analysiert, die sich lediglich in der Behandlung mit ACE-Hemmern, nicht jedoch in der Begleittherapie oder weiteren klinischen Parametern unterschieden.

Aus den Proben des linken Ventrikels wurde die RNA isoliert und die mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> und gp91<sup>phox</sup> und Nox4 durch standard-kalibrierte kompetitive bzw. semiquantitative RT-PCR quantifiziert. Die mRNA-Expression der einzelnen NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten von Patienten mit bzw. ohne ACE-Hemmer-Therapie wurden verglichen. Auf mRNA-Ebene konnte bei allen NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten keine Regulation durch ACE-Hemmer-Therapie nachgewiesen werden (p22<sup>phox</sup>:  $114 \pm 6\%$ , p47<sup>phox</sup>:  $90 \pm 5\%$ , p67<sup>phox</sup>:  $103 \pm 10\%$ , gp91<sup>phox</sup>:  $119 \pm 10\%$ , Nox4:  $109 \pm 9\%$  im Vergleich zur Expression in Patienten ohne ACE-Hemmer-Therapie,  $n \geq 6$ , siehe Abb. 3.25).

Anschließend wurde die Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten auf Proteinebene untersucht. Aus den Gewebeproben des linken Ventrikels wurden Proteine isoliert und die Protein-Expression von p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, gp91<sup>phox</sup> und Nox4 durch Western-Blot-Analysen bestimmt. Für p22<sup>phox</sup> war kein spezifischer Antikörper für die Bestimmung der Protein-Expression verfügbar. Die Protein-Expressionen der jeweiligen NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit im Myokard von Patienten mit bzw. ohne ACE-Hemmer-Therapie wurden miteinander verglichen. Dabei konnte eine signifikante Herabregulation der Protein-Expression von p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, gp91<sup>phox</sup> und Nox4 durch Behandlung mit ACE-Hemmern nachgewiesen werden (p47<sup>phox</sup>:  $52 \pm 10\%$ , p67<sup>phox</sup>:  $63 \pm 10\%$ , gp91<sup>phox</sup>:  $43 \pm 9\%$ , Nox4:  $42 \pm 6\%$  im Vergleich zur Expression in Patienten ohne ACE-Hemmer-Therapie,  $n \geq 5$ ,  $P < 0,05$ , siehe Abb. 3.26).



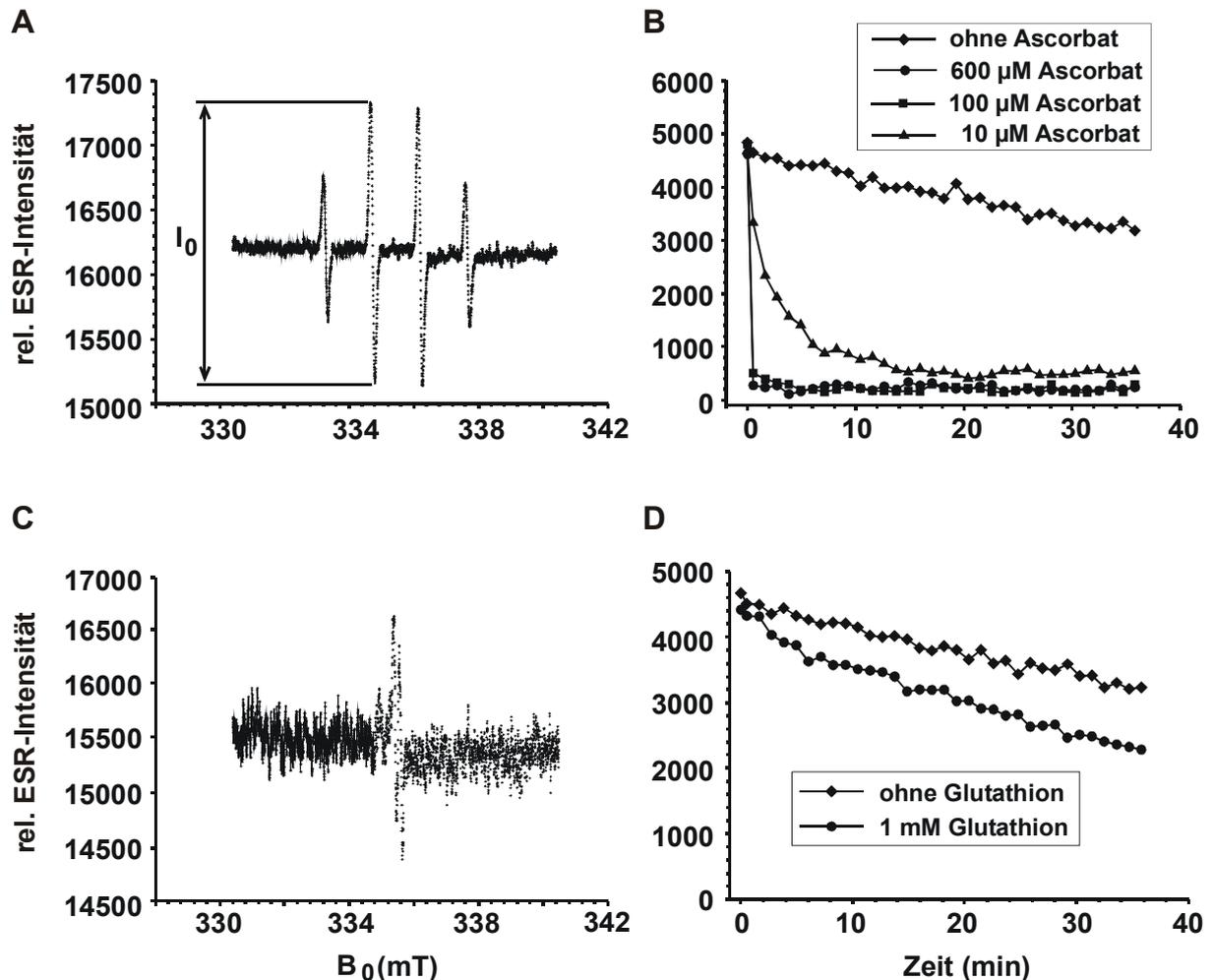
**Abb. 3.25:** Regulation der mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, gp91<sup>phox</sup> und Nox4 durch ACE-Hemmer-Therapie im Myokard des linken Ventrikels von Patienten mit Herzinsuffizienz. Aus den Proben des linken Ventrikels wurde die RNA isoliert und die mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten durch standard-kalibrierte kompetitive bzw. semiquantitative RT-PCR quantifiziert (Patienten ohne ACE-Hemmer-Therapie: n ≥ 5, Patienten mit ACE-Hemmer-Therapie: n = 29, in % der Expression in Patienten ohne ACE-Hemmer-Therapie).



**Abb. 3.26:** Regulation der Protein-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, gp91<sup>phox</sup> und Nox4 durch ACE-Hemmer-Therapie im Myokard des linken Ventrikels von Patienten mit Herzinsuffizienz. Aus den Proben des linken Ventrikels wurden die Proteine isoliert und die Protein-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten durch Western-Blot-Analysen quantifiziert (Patienten ohne ACE-Hemmer-Therapie: n ≥ 5, Patienten mit ACE-Hemmer-Therapie: n ≥ 7, \*P < 0,05, in % der Expression in Patienten ohne ACE-Hemmer-Therapie).

Um die Expressionsdaten auf funktioneller Ebene zu erweitern, sollten Untersuchungen zur Bestimmung der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität in den Ventrikelpollen durch die ESR-Methode durchgeführt werden. DEPMPO ist als *spin trap* für den Nachweis von  $\cdot\text{O}_2^-$  geeignet. Das  $\cdot\text{OOH-DEPMPO}$ -Addukt, welches durch die Reaktion von DEPMPO mit  $\cdot\text{O}_2^-$  entsteht, ist über längere Zeit stabil ( $t_{1/2} \approx 60$  min) bis es in das  $\cdot\text{OH-DEPMPO}$ -Addukt umgewandelt wird. Das von der Firma Calbiochem (Schwalbach) gelieferte DEPMPO (Lot.-Nr.: B45134) zeigte jedoch in Vorversuchen mit der  $\cdot\text{HO}$ -generierenden Fenton-Reaktion nur eine sehr begrenzte Reaktionsfähigkeit im Gegensatz zur *spin trap* DMPO. Da kommerziell

keine anderen Chargen von DEPMPO zur Verfügung standen, wurde DMPO eingesetzt. Das DMPO kann ebenfalls mit  $\cdot\text{O}_2^-$  zum  $\cdot\text{OOH-DMPO}$ -Addukt reagieren, wandelt sich jedoch innerhalb kurzer Zeit ( $t_{1/2} \approx 50$  s) in das  $\cdot\text{OH-DMPO}$ -Addukt um. Da  $\cdot\text{HO}$  mit DMPO ebenfalls zum  $\cdot\text{OH-DMPO}$ -Addukt reagiert, kann das entstehende  $\cdot\text{OH-DMPO}$  nicht mit der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung gleichgesetzt werden. Dennoch könnte eine Aussage über das in den Ventrikelpflanzen vorhandene oxidative Potential vorgenommen werden.



**Abb. 3.27:** Nachweis des mit Hilfe der Fenton-Reaktion erzeugten  $\cdot\text{OH-DMPO}$ -Adduktes durch die ESR-Spektroskopie. (A) Charakteristisches ESR-Spektrum des  $\cdot\text{OH-DMPO}$ -Adduktes;  $I_0$  = Intensität der Hyperfeinstruktur von  $\cdot\text{OH-DMPO}$ ; Reaktionsansatz: 100  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$  + 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  + 50 mM DMPO. (B) Zeitabhängige Abnahme der Signalintensität ( $I_0$ ) des paramagnetischen  $\cdot\text{OH-DMPO}$ -Adduktes durch Ascorbat (10 - 600  $\mu\text{M}$ ). (C) Charakteristisches ESR-Spektrum des Ascorbyl-Radikals; Reaktionsansatz: 100  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$  + 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  + 50 mM DMPO + 600  $\mu\text{M}$  Ascorbat. (D) Zeitabhängige Abnahme der Signalintensität ( $I_0$ ) des paramagnetischen  $\cdot\text{OH-DMPO}$ -Adduktes durch reduziertes Glutathion (1 mM).

Für die Bestimmung der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität wurde das Herzgewebe homogenisiert und anschließend DMPO zugesetzt. Im ESR-Spektrum konnten jedoch keine  $\cdot\text{OH}$ -DMPO-Addukte nachgewiesen werden. Aufgrund der Homogenisierung wurde wahrscheinlich das gesamte reduzierende Potential (u.a. Glutathion, SOD, Ascorbat, Cystein) der Zellen freigesetzt, das die paramagnetische in die diamagnetische Form des  $\cdot\text{OH}$ -DMPO umwandeln konnte.

Die Wirkung von Ascorbat und reduziertem Glutathion auf das paramagnetische  $\cdot\text{OH}$ -DMPO-Addukt, das mit Hilfe der Fenton-Reaktion erzeugt wurde, ist in Abb. 3.27 dargestellt. Die Intensitätsabnahme der Hyperfeinstruktur des  $\cdot\text{OH}$ -DMPO ( $I_0$ ) zeigt dabei den zeitabhängigen Zerfall der paramagnetischen Form an. Die im Herzen physiologischen Ascorbat-Konzentrationen (100 - 600  $\mu\text{M}$ ; Fineschi *et al.*, 2001) bewirken dagegen bereits innerhalb einer Minute die vollständige Umwandlung der paramagnetischen in die diamagnetische Form des  $\cdot\text{OH}$ -DMPO-Adduktes. Das Ascorbat selbst wurde dabei in das Ascorbyl-Radikal umgewandelt, das ebenfalls mittels der ESR-Spektroskopie sichtbar gemacht werden konnte. Die im Herzen vorkommende Glutathion-Konzentration von 1 mM (Kosower & Kosower, 1978) bewirkte ebenfalls eine Intensitätsabnahme der Hyperfeinstruktur des  $\cdot\text{OH}$ -DMPO.

Zusammenfassend konnte in diesem Abschnitt der Arbeit eine Herabregulation der Protein-Expression von  $p47^{\text{phox}}$ ,  $p67^{\text{phox}}$ ,  $gp91^{\text{phox}}$  und Nox4 im linken Ventrikel durch die Behandlung mit ACE-Hemmern bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz, jedoch keine Regulation auf mRNA-Ebene gefunden werden. Der funktionelle Nachweis der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung in den Gewebeproben war mit Hilfe der ESR-Methode nicht möglich.

## 4 Diskussion

Ein wichtiges Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von ET-1 als pro-arteriosklerotischen Stimulus auf die Entstehung von oxidativem Stress zu untersuchen. Insbesondere wurde dabei die Expression der  $\cdot\text{O}_2^-$ -generierenden NAD(P)H-Oxidase in Endothelzellen untersucht. Die gebildeten  $\cdot\text{O}_2^-$  können das in die Intima eingewanderte LDL zu oxLDL oxidieren (Steinbrecher *et al.*, 1984). Dieses oxLDL wird u.a. vom endothelialen LOX-1-Rezeptor aufgenommen (Sawamura *et al.*, 1997). Da die Entstehung von oxLDL und die Rezeptor-vermittelte Aufnahme in die Endothelzellen bei der Entwicklung und Progression der Arteriosklerose eine Rolle spielen (Mehta & Li, 2002), wurde in weitergehenden Experimenten der Effekt von ET-1 auf die Expression von LOX-1 analysiert. Ang II ist ebenfalls an der Pathogenese der Arteriosklerose beteiligt (Dzau, 1993; Fyhrquist *et al.*, 1995), da sich ET-1 und Ang II wechselseitig stimulieren (Dohi *et al.*, 1992; Rossi *et al.*, 1999). Daher wurde der Einfluss von Ang II auch auf die Expression von LOX-1 untersucht. ET-1 und Ang II regulieren als Vasokonstriktoren die Strömungsgeschwindigkeit des Blutes, die direkt proportional zur Schubspannung ist. Die mRNA Expression von ppET-1 und ECE wird durch die Applikation von arterieller laminarer Schubspannung ( $30 \text{ dyn/cm}^2$ , 24 h) herabreguliert. Dadurch wird die ET-1-Konzentration im Medium bei Applikation laminarer Schubspannung reduziert (Sharefkin *et al.*, 1991; Malek & Izumo, 1992; Morawietz *et al.*, 2000). Auch die Bildung von Ang II wird durch laminare Schubspannung reguliert. So konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Expression von ACE und dessen Aktivität nach 18 h Applikation von arterieller laminarer Schubspannung in Endothelzellen herabreguliert wird (Rieder *et al.*, 1997).

Da ET-1 (siehe 3.2.1; Duerrschmidt *et al.*, 2000) und Ang II (Rueckschloss *et al.*, 2002) die NAD(P)H-Oxidase regulieren, wurde im zweiten Teil der Arbeit die Expression der NAD(P)H-Oxidase nach Applikation laminarer Schubspannung untersucht. Zusätzlich wurde die Regulation der LOX-1-Expression durch laminare Schubspannung analysiert.

Eine Standardtherapie zur Behandlung von Bluthochdruck und Herzinsuffizienz sind ACE-Hemmer. Im letzten Teil der Arbeit wurde untersucht, ob eine ACE-Hemmer-Therapie die NAD(P)H-Oxidase im linken Ventrikel von Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz beeinflusst.

#### 4.1 Gp91<sup>phox</sup>-homologe Untereinheiten in humanen Endothelzellen

Die endotheliale NAD(P)H-Oxidase besteht aus den Untereinheiten p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> und gp91<sup>phox</sup>, die bei Zusammenlagerung das aktive Enzym bilden. Gp91<sup>phox</sup> stellt dabei die katalytische Untereinheit der NAD(P)H-Oxidase dar, die NAD(P)H-abhängig O<sub>2</sub> zu ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> reduziert (Segal & Shatwell, 1997; Yu *et al.*, 1998). Gp91<sup>phox</sup>-Homologe wurden kürzlich in verschiedenen Geweben identifiziert (Lambeth *et al.*, 2000).

In der vorliegenden Arbeit konnte anhand von RT-PCR und Western-Blot-Analysen neben gp91<sup>phox</sup> auch Nox4 in HUVEC und im humanen Myokard nachgewiesen werden. Sorescu *et al.* konnte zeitgleich ebenfalls die Expression von gp91<sup>phox</sup> und Nox4 in Endothelzellen von humanen Koronararterien zeigen (Sorescu *et al.*, 2002). Geiszt *et al.* identifizierte Nox4 erstmals in der Niere und bezeichnete die renale NAD(P)H-Oxidase als RENOX. Nox4 enthält alle konservierten Bereiche wie sechs hydrophobe Domänen und Bindungsstellen für Häm, FAD und NAD(P)H, die essentiell für die Funktion der NAD(P)H-Oxidase sind. Zusätzlich enthält Nox4 eine P-Schleife, die in Adenosintriphosphat(ATP)- bzw. GTP-bindenden Proteinen beschrieben wurde (Geiszt *et al.*, 2000). Die RENOX dient möglicherweise als O<sub>2</sub>-Sensor, der die Synthese von Erythropoietin reguliert. Diese Hypothese beruht darauf, dass ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> und die daraus resultierenden ROS proportional der lokal auftretenden O<sub>2</sub>-Konzentrationen gebildet werden. Diese oxidieren und destabilisieren dadurch den Transkriptionsfaktor Hypoxie-induzierender Faktor-1α (HIF-1α). Die durch HIF-1α regulierten Gene, einschließlich der Gene der Erythropoietin-Synthese, werden somit bei hohen O<sub>2</sub>-Konzentrationen vermindert exprimiert (Ebert & Bunn, 1999).

Die genaue Rolle von Nox4 in den Endothelzellen ist noch nicht bekannt. Sorescu *et al.* konnte jedoch in den arteriellen Endothelzellen eine 10 - 20fach erhöhte Expression von Nox4 im Gegensatz zu gp91<sup>phox</sup> zeigen. Nox4 könnte somit die katalytische Untereinheit in den Endothelzellen darstellen (Sorescu *et al.*, 2002).

Die zwei Nox-Homologen in den Endothelzellen könnten auch auf unterschiedliche Substratspezifikationen (NADPH bzw. NADH) hinweisen. Diese könnten unterschiedlich reguliert werden (Sorescu *et al.*, 2001). Die gp91<sup>phox</sup> enthaltene Oxidase in Phagozyten benötigt NADPH, um O<sub>2</sub> zu ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> zu reduzieren (Cross & Jones, 1991). Mohazzab *et al.* konnte jedoch zeigen, dass eine Zugabe von NADH zu Homogenaten von kultivierten Rinder-Koronarendothelzellen eine dreifach höhere ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Bildung im Gegensatz von NADPH bewirkt (Mohazzab *et al.*, 1994). Es wird daher vermutet, dass NADPH das Substrat von gp91<sup>phox</sup> und NADH das Substrat von Nox4 ist.

## 4.2 Induktion der Superoxidanionen-Bildung und oxLDL-Aufnahme durch ET-1 und Ang II in humanen Endothelzellen

### 4.2.1 Induktion der NAD(P)H-Oxidase durch ET-1

ET-1 spielt bei der Entstehung von kardiovaskulären Krankheiten eine wichtige Rolle (Miyachi & Masaki, 1999). So sind die ET-1-Werte im Blutplasma von Patienten mit Hypertonie und koronarer Herzkrankheit erhöht. Eine erhöhte lokale Konzentration von ET-1 wurde auch in arteriosklerotischen Plaques gemessen (Lerman *et al.*, 1991; Lerman *et al.*, 1995). Durch ET-1-Rezeptorblockade konnte in experimentellen Studien die Entstehung von arteriosklerotischen Läsionen reduziert werden (Barton *et al.*, 1998).

In der Arbeit wurde der Einfluss von ET-1 auf die Entstehung von oxidativem Stress untersucht, da Hypertonie und veränderte redox-vermittelte Signalwege bei der Entwicklung von chronischen inflammatorischen Krankheiten wie der Arteriosklerose eine Rolle spielen könnten (Offermann & Medford, 1994; Ross, 1995). Oxidativer Stress ist mit einer erhöhten Bildung von ROS, insbesondere von  $\cdot\text{O}_2^-$  verbunden. Die NAD(P)H-Oxidase stellt dabei die Hauptquelle der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung in Endothelzellen dar (Mohazzab *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 1996).

ET-1 (10 - 100 nM, 1 h) induzierte die mRNA-Expression der katalytischen NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit gp91<sup>phox</sup> in HUVEC. Diese Induktion wurde durch den ET<sub>B</sub>-Rezeptor-Inhibitor BQ-788 wieder aufgehoben. Da die Endothelzellen ausschließlich den ET<sub>B</sub>-Rezeptor exprimieren (Ogawa *et al.*, 1991; Heinroth-Hoffmann *et al.*, 1998), wird der pro-arteriosklerotische Effekt von ET-1 durch diesen Rezeptor vermittelt.

Rueckschloss *et al.* konnte zeigen, dass gp91<sup>phox</sup> die limitierende Untereinheit der NAD(P)H-Oxidase ist (Rueckschloss *et al.*, 2002). Die Regulation dieser Untereinheit ist daher ein wichtiger Indikator für die Aktivität des Enzymkomplexes. Diese Hypothese wurde durch Aktivitätsmessungen der NAD(P)H-Oxidase untersucht. Für die Bestimmung der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität wurde zunächst eine geeignete Methode etabliert. Die  $\cdot\text{O}_2^-$ -Generierung der NAD(P)H-Oxidase kann durch Chemilumineszenz quantifiziert werden. Das für die Chemilumineszenz häufig verwendete Lucigenin kann sich selbst oxidieren und dabei  $\cdot\text{O}_2^-$  freisetzen. Lucigenin ist daher, insbesondere in hohen Konzentrationen, nur bedingt ein zuverlässiger Indikator (Liochev & Fridovich, 1997; Vasquez-Vivar *et al.*, 1997). Dagegen war die Bestimmung der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Generierung in Neutrophilen durch Coelenterazin-vermittelte Chemilumineszenz eine geeignete und sensitive Methode (Lucas & Solano, 1992). Tarpey *et*

al. konnte zeigen, dass Coelenterazin im Gegensatz zu Lucigenin keine  $\cdot\text{O}_2^-$  durch Autooxidation freisetzt (Tarpey *et al.*, 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde die Spezifität und Sensitivität für  $\cdot\text{O}_2^-$  von Coelenterazin gegenüber Lucigenin mit Hilfe des Xanthin-Oxidase/Xanthin-Systems überprüft. Dabei zeigte Coelenterazin im Gegensatz zu Lucigenin eine höhere Sensitivität. Die Coelenterazin-vermittelte Chemilumineszenz konnte durch Zugabe von SOD und Diphenyliodoniumchlorid verhindert werden. Dabei wandelte die SOD das von der Xanthin-Oxidase generierte  $\cdot\text{O}_2^-$  zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  um. Die Hemmung durch Diphenyliodoniumchlorid gibt Auskunft über die Enzymquelle der gebildeten  $\cdot\text{O}_2^-$ . Diphenyliodoniumchlorid hemmt als Flavoenzym-Inhibitor sowohl die Xanthin-Oxidase als auch die NAD(P)H-Oxidase.

Die Chemilumineszenz-Methode wurde für die Detektion von  $\cdot\text{O}_2^-$  in Endothelzellen modifiziert. Dabei wurden die HUVEC in Pyrex-Röhrchen kultiviert und die  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung direkt nach Zugabe von Coelenterazin im Chemiluminometer quantifiziert. Nach Inkubation der Endothelzellen mit ET-1 (10 nM, 90 min) konnte eine erhöhte  $\cdot\text{O}_2^-$ -Generierung gemessen werden.

Die aktive NAD(P)H-Oxidase ist vorwiegend in der Plasmamembran, aber auch in Mikrosomen lokalisiert (Mohazzab & Wolin, 1994). Nukleotide können die Zellmembran nicht passieren (Bishop *et al.*, 1959; Liersch *et al.*, 1971). Eine Zugabe von NADPH zu den mit ET-1 stimulierten HUVEC bewirkte nur eine geringe Zunahme der Chemilumineszenz. Dies spricht für eine intakte Plasmamembran der kultivierten Endothelzellen. Das lipophile Coelenterazin kann dagegen die Zellmembran passieren. Mit der Coelenterazin-vermittelten Chemilumineszenz-Methode wurden daher auch intrazellulär gebildete  $\cdot\text{O}_2^-$  nachgewiesen. Eine Zugabe von SOD und Diphenyliodoniumchlorid zeigten nur einen minimalen inhibitorischen Effekt auf die Chemilumineszenz in den intakten HUVEC. Dabei kann die SOD, aufgrund ihrer molekularen Größe, nicht die Membran passieren. Die Befunde unterstützen daher das Konzept einer primär intrazellulären  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung. Diphenyliodoniumchlorid könnte auf Grund seiner polaren Eigenschaften die Zellmembran nicht in den Konzentrationen passieren, die zur vollständigen Hemmung der Chemilumineszenz notwendig sind. Da die NAD(P)H-Oxidase die Hauptquelle der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung in den Endothelzellen darstellt, ist die erhöhte Chemilumineszenz wahrscheinlich vorrangig auf dieses Enzym zurückzuführen. Jedoch könnten auch andere  $\cdot\text{O}_2^-$ -generierende Enzyme beteiligt sein.

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) kann mit dem ET-1-System interagieren. Ang II zählt wie das ET-1 zu den Vasokonstriktoren. Ang II-Stimulation erhöht die Expression von ppET-

1 und ET-1-Synthese in kultivierten glatten Muskelzellen und Endothelzellen (Rossi *et al.*, 1999). Maki *et al.* konnte ebenfalls eine erhöhte ET-1-Expression in Herzen von Ang II-überexprimierenden Mäusen zeigen (Maki *et al.*, 1998). Nach 7 h Ang II-Inkubation konnte Rueckschloss *et al.* eine erhöhte mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit gp91<sup>phox</sup> und eine Induktion der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung in HUVEC nachweisen (Rueckschloss *et al.*, 2002). Zusätzlich wurde kürzlich eine erhöhte Expression der gp91<sup>phox</sup>-homologen Untereinheiten Nox1 und Nox4 durch das RAS *in vivo* und *in vitro* beschrieben (Wingler *et al.*, 2001). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ET-1 bereits nach einer Stunde die mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten und die  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung in HUVEC induziert.

ET-1 ist bei der Entstehung und Progression von kardiovaskulären Krankheiten wie Arteriosklerose, Hypertonie und koronarer Herzkrankheit beteiligt (Schiffrin & Touyz, 1998; Miyauchi & Masaki, 1999). Ein pathophysiologischer Mechanismus von ET-1 könnte eine erhöhte ET-1-vermittelte  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung sein. Die induzierte  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung könnte zu einer vermehrten Bildung von zytotoxischem ONOO<sup>-</sup> und oxLDL führen. Die Entstehung von ONOO<sup>-</sup> aus  $\cdot\text{O}_2^-$  und  $\cdot\text{NO}$  (Pryor & Squadrito, 1995) reduziert die Verfügbarkeit des endothelialen Vasodilatators  $\cdot\text{NO}$ . Im weiteren beeinträchtigt eine erhöhte Bildung von ONOO<sup>-</sup> antioxidative Abwehrmechanismen (Davidson *et al.*, 1997; Padmaja *et al.*, 1998; Quijano *et al.*, 2001) und aktiviert Signalmechanismen, die zu Apoptose und Zelltod führen (Wolin *et al.*, 1997; Callsen *et al.*, 1999; Takakura *et al.*, 1999). Das oxLDL reduziert zusätzlich die Expression der eNOS (Kugiyama *et al.*, 1990) und induziert die Bildung von ROS in den Gefäßen (Lehr *et al.*, 1992; Galle *et al.*, 1995). Darüber hinaus induziert oxLDL die Expression von Adhäsionsmolekülen (Khan *et al.*, 1995) und die Apoptose in Endothelzellen (Dimmeler *et al.*, 1997). In der späteren Phase der Arteriosklerose wird das oxLDL von den in die Intima eingewanderten Makrophagen durch Scavenger-Rezeptor aufgenommen. Dadurch kommt es zur Schwammzellbildung (Ross, 1999).

#### 4.2.2 Induktion von LOX-1 durch ET-1 und Ang II

Das in der Intima akkumulierende LDL wird durch  $\cdot\text{O}_2^-$  zu oxLDL oxidiert (Steinbrecher *et al.*, 1984). Endothelzellen können das entstehende oxLDL durch den LOX-1-Rezeptor aufnehmen (Sawamura *et al.*, 1997).

In der vorliegenden Arbeit konnte nach ET-1-Inkubation (100 nM, 1 h) auch eine erhöhte LOX-1-Expression auf mRNA- und Proteinebene in HUVEC gezeigt werden. Die oxLDL-

Aufnahme wurde nach ET-1-Stimulation ebenfalls erhöht. Die Induktion der LOX-1-mRNA-Expression und die oxLDL-Aufnahme waren ET<sub>B</sub>-Rezeptor-vermittelt. Ein ET<sub>B</sub>-Rezeptor-vermittelter pro-arteriosklerotischer Mechanismus konnte bereits bei der Induktion der endothelialen NAD(P)H-Oxidase gezeigt werden (Duerschmidt *et al.*, 2000). So induziert ET-1 durch  $\cdot\text{O}_2^-$ -Generierung eine vermehrte Bildung von oxLDL und zusätzlich eine erhöhte oxLDL-Aufnahme durch LOX-1.

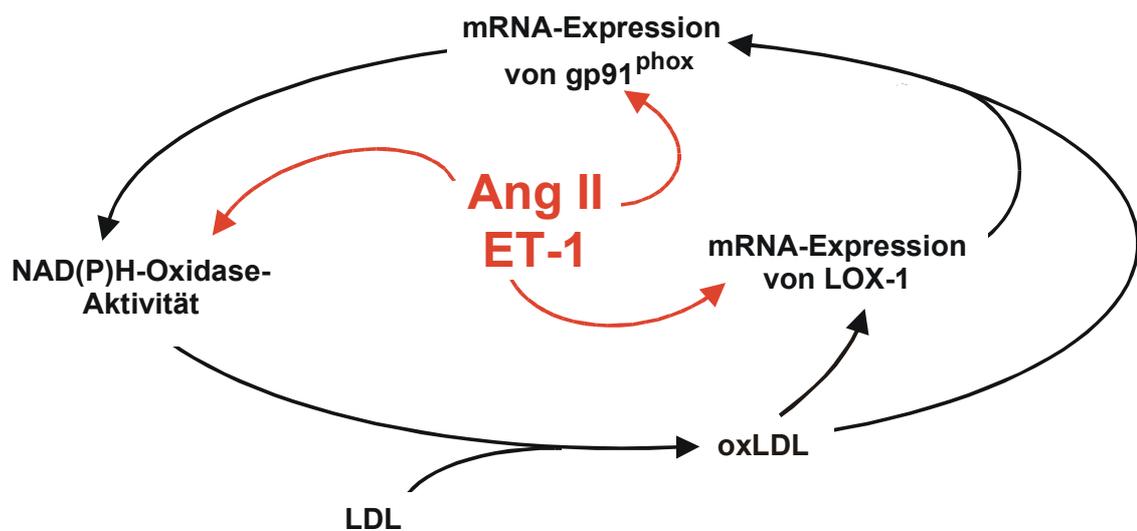
Auch systemisch oder lokal erhöhte Konzentrationen von Ang II tragen zur Hypertonie-Entstehung bei (Dzau, 1993; Fyhrquist *et al.*, 1995). Das pro-arteriosklerotische Potenzial von Ang II könnte auch eine Induktion der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung beinhalten. Chronische Infusion von Ang II führt in Ratten zu einer erhöhten vaskulären  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung, die an der Ausbildung einer endothelialen Dysfunktion und Bluthochdruck beteiligt ist (Rajagopalan *et al.*, 1996). Auch im Kaninchen-Modell führt die Aktivierung des RAS zu erhöhter vaskulärer  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung und endothelialer Dysfunktion (Pagano *et al.*, 1997). Die NAD(P)H-Oxidase scheint dabei eine wichtige Rolle zu spielen. So konnte Rueckschloss *et al.* eine erhöhte Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit gp91<sup>phox</sup> und eine verstärkte Bildung von  $\cdot\text{O}_2^-$  durch Ang II in humanen Endothelzellen zeigen (Rueckschloss *et al.*, 2002).

In weitergehenden Analysen wurde der Einfluss von Ang II auf die Regulation von LOX-1 und oxLDL-Aufnahme in HUVEC untersucht. Die Ergebnisse zeigten auf mRNA- und Proteinebene eine Induktion von LOX-1 durch Ang II (100 nM, 3 h). Darüber hinaus konnte eine erhöhte oxLDL-Aufnahme in humanen Endothelzellen nachgewiesen werden (Morawietz *et al.*, 1999). Diese Arbeiten werden durch unabhängige Untersuchungen von Li *et al.* in humanen Endothelzellen aus Koronararterien bestätigt (Li *et al.*, 1999). LOX-1 könnte daher ein neues Bindeglied zwischen Hypertonie und Arteriogenese sein (Kita, 1999). Eine erhöhte oxLDL-Aufnahme kann die endothelial vermittelte Gefäßrelaxation durch verminderte Expression der eNOS (Laufs *et al.*, 1998) und verstärkte ROS-Bildung (Lehr *et al.*, 1992) beeinträchtigen. Das oxLDL kann die Infiltration von Makrophagen durch eine erhöhte endotheliale Expression von Adhäsionsmolekülen (Khan *et al.*, 1995) und die Sekretion von Wachstumsfaktoren, die eine Proliferation der glatten Muskelzellen induzieren (Chai *et al.*, 1996), stimulieren. Da oxLDL auch pro-koagulative Effekte vermittelt (Ardlie *et al.*, 1989; Drake *et al.*, 1991; Wada *et al.*, 1994), kann eine vermehrte Bildung und Aufnahme von oxLDL zur Entstehung und Progression von kardiovaskulären Erkrankungen beitragen.

### 4.2.3 *Circulus vitiosus* der endothelialen Radikalbildung

Ang II (Rueckschloss *et al.*, 2002) und oxLDL (Rueckschloss *et al.*, 2001) können synergistisch den oxidativen Stress durch die Induktion der mRNA-Expression der limitierenden NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit gp91<sup>phox</sup> in Endothelzellen erhöhen. Das in die Intima eingewanderte LDL wird durch die vermehrt entstehenden Radikale zu oxLDL modifiziert. Diese können anschließend die Expression von gp91<sup>phox</sup> erneut induzieren. Die daraufhin verstärkte  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung kann wiederum zur weiteren Generierung von oxLDL beitragen, so dass ein pro-arteriosklerotischer *Circulus vitiosus* entsteht. Da Ang II (Morawietz *et al.*, 1999) und oxLDL (Li & Mehta, 2000) den endothelialen oxLDL-Rezeptor LOX-1 induzieren, wird das gebildete oxLDL zusätzlich vermehrt aufgenommen.

ET-1 kann aufgrund der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse ebenfalls diesen *Circulus vitiosus* potenzieren (siehe Abb. 4.1).



**Abb. 4.1:** *Circulus vitiosus* der endothelialen  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung. Ang II und ET-1 stimulieren die Induktion der mRNA-Expression der limitierenden NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit gp91<sup>phox</sup> und die endotheliale  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung. Das in die Intima eingewanderte LDL wird durch die erhöhte Radikalbildung zu oxLDL modifiziert. Das oxLDL induziert die Expression von gp91<sup>phox</sup> und damit die NAD(P)H-Oxidase-Aktivität. Ang II, ET-1 und oxLDL induzieren zusätzlich den LOX-1-Rezeptor.

### 4.3 Verminderte Superoxidationen-Bildung und oxLDL-Aufnahme durch arterielle laminare Schubspannung in humanen Endothelzellen

#### 4.3.1 Herabregulation der NAD(P)H-Oxidase durch arterielle laminare Schubspannung

De Keulenaer *et al.* konnte kürzlich eine erhöhte  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung durch oszillatorische sowie durch verringerte laminare Schubspannung ( $5 \text{ dyn/cm}^2$ ) nach 1 - 5 h in Zellextrakten aus HUVEC nachweisen. Nach 24 h war die  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung nur noch transient im Vergleich zur Kontrolle erhöht (De Keulenaer *et al.*, 1998). Die Expression der endothelialen NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten auf mRNA- bzw. Proteinebene und die extrazelluläre  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung in nativen Zellen wurde bisher jedoch nicht untersucht.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten bei einer laminaren Schubspannung von  $5 \text{ dyn/cm}^2$  nach 24 h nicht reguliert wird. Dagegen wurde die mRNA-Expression der Untereinheiten gp91<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> und Nox4 durch arterielle laminare Schubspannung von  $30 \text{ dyn/cm}^2$  nach 24 h herabreguliert. Zusätzlich wurde die  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung nach Schubspannung von  $30 \text{ dyn/cm}^2$  für 24 h verringert.

Die NAD(P)H-Oxidase des phagozytären Typs generiert  $\cdot\text{O}_2^-$  hauptsächlich extrazellulär (Meier *et al.*, 1991; Zulueta *et al.*, 1995). Diese  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung kann durch die Cytochrom c-Methode quantifiziert werden. Da Cytochrom c aufgrund seines Molekulargewichts nicht die Zellmembran passiert, kann es nur von extrazellulären Substanzen reduziert werden. Die Spezifität des  $\cdot\text{O}_2^-$ -Nachweises wurde durch den Einsatz von SOD und CAT gewährleistet.

Interessanterweise ist die Regulation der NAD(P)H-Oxidase durch arterielle Schubspannung  $\cdot\text{NO}$  vermittelt. Mögliche Signalwege zur Regulation der NAD(P)H-Oxidase durch die Schubspannung sind in der Abb. 4.2 zusammengefasst. Die eNOS-Expression wird durch arterielle laminare Schubspannung (24 h) über eine Aktivierung der MAP-Kinasen induziert (Uematsu *et al.*, 1995; Busse & Fleming, 1998; Davis *et al.*, 2001). Auch konnte zusätzlich eine erhöhte Aktivität der eNOS durch Schubspannung nachgewiesen werden. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch noch nicht im Detail verstanden. Es scheinen  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige und  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Aktivierungsmechanismen zu existieren. Bei den  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Mechanismen werden spezifische Proteinkinasen aktiviert, die letztendlich zu einer erhöhten eNOS-Aktivität führen (Dimmeler *et al.*, 1999; Fisslthaler *et al.*, 2000; Boo *et al.*, 2002a; Boo *et al.*, 2002b). Diese Proteinkinasen stehen mit Membran-assoziierten Integrinen in Verbindung. Die extrazellulären Domänen der Integrine vermitteln



vermittelt werden (Kohler *et al.*, 1999; Marchenko & Sage, 2000; Sun *et al.*, 2001). Diese SACs konnten in vaskulären Endothelzellen nachgewiesen werden. Sie wirken als Mikrosensoren, die Änderungen der hämodynamischen Kräfte erkennen (Lansman *et al.*, 1987; Naruse & Sokabe, 1993; Hoyer *et al.*, 1997). Brakemeier *et al.* konnte eine erhöhte Anzahl und Mechanosensitivität von SACs durch Applikation laminarer Schubspannung in HUVEC zeigen (Brakemeier *et al.*, 2002). Nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung bindet das  $\text{Ca}^{2+}$  an das ungebundene Calmodulin. In der Primärstruktur von der eNOS konnte eine Bindungsdomäne für Calmodulin indentifiziert werden (Bredt *et al.*, 1991; Marsden *et al.*, 1992; Nishida *et al.*, 1992). Die Bindung des Calmodulin/ $\text{Ca}^{2+}$ -Komplexes an die eNOS ist für die Enzym-Aktivität essentiell (Michel & Feron, 1997). Aufgrund der schnellen Phosphorylierung der eNOS durch Proteinkinasen wird auch eine zunehmende Sensitivität für Calmodulin vermutet (Corson *et al.*, 1996).

Im ersten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass ET-1 die NAD(P)H-Oxidase induziert (Duerrschmidt *et al.*, 2000). Darüber hinaus induziert Ang II dosisabhängig die NAD(P)H-Oxidase-Expression und Aktivität (Rueckschloss *et al.*, 2002). Arterielle laminare Schubspannung (24 h) verringert die mRNA-Expression von ppET-1, von ECE-1a und ECE-1b bzw. die daraus resultierende ET-1-Freisetzung (Sharefkin *et al.*, 1991; Morawietz *et al.*, 2000). Dieser Prozess ist partiell  $\cdot\text{NO}$  vermittelt (Kuchan & Frangos, 1993). Die Expression des  $\text{ET}_B$ -Rezeptor wird jedoch  $\cdot\text{NO}$ -abhängig durch Schubspannung induziert (Morawietz *et al.*, 2000). Da der  $\text{ET}_B$ -Rezeptor als Clearance-Rezeptor die ET-1-Konzentration reduzieren kann, wird dieser Effekt auch als anti-arteriosklerotischer Mechanismus diskutiert.

Ang II, das aktive Peptid des RAS, kann die Synthese von ET-1 stimulieren (Dohi *et al.*, 1992). Das ET-1 selbst kann wiederum die Ang II-Synthese beeinflussen (Rossi *et al.*, 1999). Eine Herabregulation der mRNA-Expression von ACE und dessen Aktivität konnte durch Applikation arterieller laminarer Schubspannung nach 18 h in Endothelzellen gezeigt werden (Rieder *et al.*, 1997).

Daher könnte die verminderte Expression von  $\text{gp91}^{\text{phox}}$ ,  $\text{p47}^{\text{phox}}$  und Nox4 durch Schubspannung über die Regulation der ET-1- und Ang II-Freisetzung vermittelt werden, da eine  $\text{ET}_B$ - bzw.  $\text{AT}_1$ -Rezeptorblockade diesen Effekt wieder aufhebt.

Das vom  $\cdot\text{NO}$ -Donor DETA-NO freigesetzte  $\cdot\text{NO}$  bewirkte in stationären Endothelzellen sowohl eine verminderte NAD(P)H-Oxidase-Expression als auch eine verminderte  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung. Darüber hinaus zeigte die Hemmung der eNOS einen Einfluss auf die Regulation der NAD(P)H-Oxidase und  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung. Die Herabregulation der mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten  $\text{p47}^{\text{phox}}$ ,  $\text{gp91}^{\text{phox}}$  und NOX4 durch Schubspannung wurde

mit L-NAME verhindert. Auf funktioneller Ebene konnte ebenfalls die verminderte Bildung von  $\cdot\text{O}_2^-$  bei Schubspannung durch L-NAME gehemmt werden. Das  $\cdot\text{NO}$  scheint somit eine wichtige Rolle bei der Regulation der NAD(P)H-Oxidase zu spielen.

Eine tendenziell erhöhte  $\cdot\text{O}_2^-$ -Konzentration konnte im Medium der stationären Endothelzellen (Kontrolle), die 24 h mit L-NAME behandelt wurden, gemessen werden. Unter Normalbedingungen wird das von den Zellen gebildete  $\cdot\text{O}_2^-$  zum Teil von  $\cdot\text{NO}$  unter Bildung von  $\text{ONOO}^-$  entzogen. Bei Hemmung der  $\cdot\text{NO}$ -Produktion durch spezifische Inhibitoren der NOS (u.a. L-NNA, L-NAME) erhöht sich die Konzentration von  $\cdot\text{O}_2^-$ . Mehr  $\cdot\text{O}_2^-$ -Moleküle sind somit nachweisbar (Munzel *et al.*, 2000).

Darüber hinaus sind die PKC und Tyrosinkinase in die Regulation der Expression von  $\text{p47}^{\text{phox}}$  involviert. Für die anderen Untereinheiten konnte allerdings kein modulierender Effekt nachgewiesen werden.

Die durch arterielle laminare Schubspannung verminderte  $\cdot\text{O}_2^-$ -Generierung der endothelialen NAD(P)H-Oxidase reduziert zusätzlich die Bildung von  $\text{ONOO}^-$ . Dadurch wird die  $\cdot\text{NO}$ -Verfügbarkeit erhöht und weniger LDL zu oxLDL oxidiert. Dies könnte zum anti-arteriosklerotischen Potential laminarer Schubspannung beitragen.

#### **4.3.2 Herabregulation der oxLDL-Aufnahme durch arterielle laminare Schubspannung**

Der Einfluss laminarer Schubspannung auf die Expression des oxLDL-Rezeptor LOX-1 wurde bisher nur für kurze Zeiträume (4 h) in Rinder-Endothelzellen untersucht. Dabei konnte eine transient erhöhte LOX-1-mRNA-Expression nachgewiesen werden (Murase *et al.*, 1998). Die Regulation von LOX-1 durch langfristige Applikation von laminarer Schubspannung wurde jedoch noch nicht untersucht.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass laminare Schubspannung ( $30 \text{ dyn/cm}^2$ ) nach 24 h die LOX-1-mRNA-Expression tendenziell, ohne jedoch das Signifikanzniveau zu erreichen, verringerte. Die oxLDL-Aufnahme war dagegen signifikant nach 24 h arterieller laminarer Schubspannung vermindert.

Arterielle laminare Schubspannung kann damit nicht nur die  $\cdot\text{O}_2^-$ - und die oxLDL-Bildung reduzieren, sondern verringert auch die funktionelle Aufnahme von oxLDL in Endothelzellen. Ob die LOX-1-vermittelte Aufnahme dabei eine Schlüsselstellung einnimmt, ist Gegenstand laufender Untersuchungen. Der oben beschriebene Mechanismus könnte die durch oxLDL vermittelte endotheliale Dysfunktion (Kusuhara *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997; Han *et al.*,

1998b; Cominacini *et al.*, 2001) und die Entstehung und Progression der Arteriosklerose inhibieren.

#### **4.4 Verminderte Protein-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten durch ACE-Hemmer-Therapie**

Die Bedeutung von NAD(P)H-Oxidase-generierten ROS im Myokard ist bisher kaum untersucht worden. Kürzlich wurde im linken Ventrikel von Ratten nach Infarkt eine erhöhte Expression von p22<sup>phox</sup> und gp91<sup>phox</sup> nachgewiesen. Aufgrund einer verstärkten ROS-Bildung konnte dabei auch eine erhöhte Lipid-Oxidation nachgewiesen werden (Fukui *et al.*, 2001). Diese tierexperimentellen Befunde lassen eine erhöhte NAD(P)H-Oxidase-Aktivität im Myokard bei kardiovaskulären Erkrankungen vermuten.

Klinische und experimentelle Studien zeigen, dass Ang II an der Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen wie Hypertonie, koronarer Herzkrankheit, Myokarditis und Herzinsuffizienz beteiligt ist. ACE-Hemmer werden heute als Standardtherapie in der Behandlung von Hypertonie bzw. Herzinsuffizienz eingesetzt und senken in zahlreichen klinischen Studien Mortalität und Morbidität (Garg & Yusuf, 1995; Flather *et al.*, 2000). Ang II kann die NAD(P)H-Oxidase-Expression und die daraus resultierende  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung in Gefäßzellen erhöhen (Griendling *et al.*, 1994; Ushio-Fukai *et al.*, 1996; Rueckschloss *et al.*, 2002). Die Inhibierung der Ang II-Bildung durch ACE-Hemmer senkt die induzierte Bildung von ROS (Zhang *et al.*, 1999; Wolf, 2000; Tsutsui *et al.*, 2001).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die ACE-Hemmer-Therapie bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz keinen Einfluss auf die mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten im Myokard des linken Ventrikels hat. Dagegen konnte auf Proteinebene eine Herabregulation der Untereinheiten p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, gp91<sup>phox</sup> und Nox4 durch Behandlung mit ACE-Hemmern nachgewiesen werden. Dies spricht für ein antioxidatives Potential von ACE-Hemmern im humanen Myokard. Ein Teil der gemessenen NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten könnte aus den Phagozyten stammen, die in das Myokard infiltriert sind. Unabhängig von der Quelle könnte der erhöhte oxidative Stress jedoch die Versorgung des Myokards durch eingeschränkte Gefäßfunktion verschlechtern.

Die Quantifizierung der gebildeten  $\cdot\text{O}_2^-$  in den Ventrikelproben sollte mit Hilfe der ESR-Spektroskopie erfolgen. DEPMPO ist für den Nachweis von  $\cdot\text{O}_2^-$  eine optimale *spin trap*. Diese Substanz zeigte jedoch in Vorversuchen nur eine begrenzte Reaktionsfähigkeit, so dass auf die Verwendung von DMPO zurückgegriffen wurde. In den homogenisierten

Ventrikelpollen konnten jedoch keine durch  $\cdot\text{O}_2^-$  bzw.  $\cdot\text{OH}$  hervorgerufene  $\cdot\text{OH}$ -DMPO-Addukte nachgewiesen werden. Wahrscheinlich wurde während der Homogenisierung das gesamte reduzierende Potential der Zellen freigesetzt, das die paramagnetische Form in die diamagnetische Form des  $\cdot\text{OH}$ -DMPO-Adduktes umwandelte. Ascorbat und reduziertes Glutathion sind zwei Vertreter von Antioxidantien, die die Zelle vor oxidativem Stress schützt. Deren reduzierende Wirkung konnte in der ESR-Spektroskopie verfolgt werden. Die im Herzen physiologisch vorkommenden Ascorbat-Konzentrationen waren in der Lage, das in der ESR-Spektroskopie sichtbare  $\cdot\text{OH}$ -DMPO-Addukt bereits innerhalb von einer Minute zu hemmen. Die Zugabe der physiologischen Konzentration von reduziertem Glutathion führte ebenfalls zur Intensitätsabnahme der Hyperfeinstruktur von  $\cdot\text{OH}$ -DMPO. Da die Zelle jedoch eine Vielzahl von unterschiedlichen Reduktionsmitteln zur Verfügung hat, scheint eine vollständige Hemmung aller sehr unwahrscheinlich zu sein.

Die Enzymaktivität der NAD(P)H-Oxidase könnte zusätzlich auch durch die Lagerung der linken Ventrikel im flüssigem  $\text{N}_2$  beeinträchtigt sein, da die native Proteinstruktur bei Einfrierung zerstört werden kann (Kälte-denaturierung).

Die Ergebnisse sind jedoch der erste Hinweis, dass die Protein-Expression der NAD(P)H-Untereinheiten durch die Behandlung von ACE-Hemmern bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz herabreguliert wird. Dies könnte auch zu einer verringerten Bildung von ROS im Myokard und damit zum kardioprotektiven Potential von ACE-Hemmern in der Behandlung von Patienten mit Herzinsuffizienz beitragen.

## 5 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war, die Analyse potenzieller Mechanismen der Ausbildung und Lokalisation von arteriosklerotischen Plaques auf molekularer Ebene. Dadurch sollen molekulare Mechanismen der Arteriosklerose besser verstanden werden.

Eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von Arteriosklerose werden den vaskulär gebildeten ROS zugeschrieben.  $\cdot\text{O}_2^-$  nehmen innerhalb der ROS eine zentrale Stellung ein.  $\cdot\text{O}_2^-$  können den Vasodilator  $\cdot\text{NO}$  inaktivieren. Dies führt zu einer endothelialen Dysfunktion. Anti-arteriosklerotische Effekte des  $\cdot\text{NO}$  sind die verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen, die Hemmung der Thrombozyten-Aggregation und der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen. Darüber hinaus ist  $\cdot\text{O}_2^-$  an der oxidativen Modifikation von LDL zu oxLDL beteiligt. Das oxLDL vermindert die Expression der eNOS und induziert die Bildung von ROS. Auch stimuliert oxLDL die Produktion von Adhäsionsmolekülen und chemotaktischen Faktoren sowie die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen. Somit fördern die Inaktivierung von  $\cdot\text{NO}$  und die Generierung von oxLDL die Entstehung und Progression der Arteriosklerose.

Als Hauptquelle der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung wurde die endotheliale NAD(P)H-Oxidase identifiziert. Diese besteht aus vier essentiellen Untereinheiten. Gp91<sup>phox</sup> und p22<sup>phox</sup> bilden das membranständige Cytochrom b<sub>558</sub>. Die zytosolischen Untereinheiten p47<sup>phox</sup> und p67<sup>phox</sup> binden nach Aktivierung an das Cytochrom b<sub>558</sub>. Die Zusammenlagerung aller Untereinheiten initiiert die Bildung von  $\cdot\text{O}_2^-$ . In den HUVEC konnten alle NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde eine gp91<sup>phox</sup>-homologe Untereinheit Nox4 identifiziert. Das Vorkommen und die Funktion der beiden homologen Komponenten in den Endothelzellen konnte jedoch noch nicht geklärt werden.

Der Vasokonstriktor Ang II induziert oxidativen Stress durch Stimulation der endothelialen NAD(P)H-Oxidase in der Gefäßwand. Die Induktion des oxidativen Stresses ist mit einer Erhöhung des Blutdruckes verbunden. Die durch Ang II induzierten Effekte werden durch ET-1 potenziert. In dieser Arbeit wurde deshalb der Effekt von ET-1 auch auf die Regulation der endothelialen NAD(P)H-Oxidase untersucht. Es konnte durch kompetitive RT-PCR gezeigt werden, dass ET-1 (10 - 100 nM) die mRNA-Expression der limitierenden NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit gp91<sup>phox</sup> nach 1 h in HUVEC induziert. Dieser Effekt wurde durch den ET<sub>B</sub>-Rezeptor vermittelt. Für die Bestimmung der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Generierung wurde die sensitive und spezifische Methode der Coelenterazin-vermittelten Chemilumineszenz verwendet. Die

verstärkte mRNA-Expression von gp91<sup>phox</sup> war auch mit einer erhöhten Bildung von  $\cdot\text{O}_2^-$  verbunden.

Die erhöhte  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung kann zu einer vermehrten oxidativen Modifikation von LDL führen. LOX-1 ist als oxLDL-Rezeptor ein potentieller Vermittler der oxLDL-abhängigen pro-arteriosklerotischen Effekte in Endothelzellen. Deshalb wurde die Regulation von LOX-1 durch ET-1 untersucht. ET-1 (100 nM) induzierte die Expression von LOX-1 auf mRNA- und Proteinebene nach 1 h. Dies konnte durch kompetitive RT-PCR und Western-Blot-Analysen nachgewiesen werden. Diese Befunde werden durch eine erhöhte Aufnahme von DiI-markiertem oxLDL nach 1 h in den HUVEC bestätigt. Die Induktion der LOX-1-mRNA-Expression und der oxLDL-Aufnahme wurde ebenfalls durch den ET<sub>B</sub>-Rezeptor vermittelt. Auch Ang II induzierte dosisabhängig sowohl die Expression von LOX-1 auf mRNA- und Proteinebene sowie die oxLDL-Aufnahme nach 3 h. Diese Induktion wurde durch den Angiotensin II-Rezeptors Typ 1 (AT<sub>1</sub>) vermittelt.

Die Ergebnisse zur Regulation der NAD(P)H-Oxidase- und LOX-1-Expression können in einem pro-arteriosklerotischen *Circulus vitiosus* der endothelialen  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung zusammengefasst werden. Sowohl Ang II, als auch ET-1 stimulieren die mRNA-Expression der limitierenden NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit gp91<sup>phox</sup> und die endotheliale  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung. Das in die Intima eingewanderte LDL wird durch die erhöhte Bildung von  $\cdot\text{O}_2^-$  zu oxLDL modifiziert. Das oxLDL kann wiederum die Expression von gp91<sup>phox</sup> und damit die NAD(P)H-Oxidase-Aktivität induzieren. Ang II, ET-1 und oxLDL induzieren zusätzlich die Expression von LOX-1.

Arterielle laminare Schubspannung wird als anti-arteriosklerotischer Schutzmechanismus angesehen. So hemmt laminare Schubspannung die Bildung von ET-1 und Ang II sowie die Adhäsion und Migration von Monozyten bzw. Makrophagen durch verminderte Expression von chemotaktischen Faktoren und Adhäsionsmolekülen. Darüber hinaus kann laminare Schubspannung die  $\cdot\text{NO}$ -Freisetzung stimulieren. Der Einfluss von laminarer Schubspannung auf die Expression der NAD(P)H-Oxidase war jedoch bisher noch nicht untersucht worden. Deshalb wurde im zweiten Teil der Arbeit die Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten und die Bildung von  $\cdot\text{O}_2^-$  nach Applikation von laminarer Schubspannung in einem Plattenkegel-Viskosimeter untersucht. Arterielle laminare Schubspannung von 30 dyn/cm<sup>2</sup> verminderte die mRNA-Expression von p47<sup>phox</sup>, gp91<sup>phox</sup> und Nox4 nach 24 h in HUVEC. Die Protein-Expression dieser Untereinheiten wurde ebenfalls herabreguliert. Die Generierung von  $\cdot\text{O}_2^-$  wurde spezifisch mit Hilfe der Cytochrom c-Nachweismethode quantifiziert. Durch Applikation von arterieller laminarer Schubspannung (30 dyn/cm<sup>2</sup>) wurde

die  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung von HUVEC auch nach 24 h verringert. Ang II und ET-1 sind an der Herabregulation der NAD(P)H-Oxidase-Expression durch Schubspannung beteiligt, da durch Blockade des  $\text{ET}_B$ -Rezeptors bzw. des  $\text{AT}_1$ -Rezeptors dieser Effekt wieder aufgehoben werden konnte. Auch eine Hemmung der eNOS blockierte die Herabregulierung der NAD(P)H-Oxidase-Expression durch Schubspannung. Eine 24-stündige Inkubation von stationären HUVEC mit dem  $\cdot\text{NO}$ -Donor DETA-NO verringerte die Expression von  $\text{p47}^{\text{phox}}$  und  $\text{gp91}^{\text{phox}}$  sowie die  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung. Die Herabregulation der mRNA-Expression von  $\text{p47}^{\text{phox}}$  durch Schubspannung wurde zusätzlich durch die PKC und Tyrosinkinasen vermittelt.

Die durch laminare Schubspannung verringerte  $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung sollte die Bildung von oxLDL reduzieren. Zusätzlich wurde im weiteren die Expression des oxLDL-Rezeptors LOX-1 durch Applikation von laminarer Schubspannung ( $30 \text{ dyn/cm}^2$ ) untersucht. Nach 24 h konnte eine signifikante Herabregulation der oxLDL-Aufnahme in den humanen Endothelzellen nachgewiesen werden. Jedoch wurde zum gleichen Zeitpunkt auf mRNA-Ebene nur eine tendenziell verminderte mRNA-Expression von LOX-1 beobachtet.

Eine Standardtherapie zur Behandlung von Bluthochdruck und Herzinsuffizienz sind die ACE-Hemmer. Im dritten Teil der Arbeit wurde der Einfluss einer ACE-Hemmer-Therapie auf die Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten im linken Ventrikel von Patienten mit Herzinsuffizienz untersucht. Dabei konnte nach Behandlung mit ACE-Hemmern keine Regulation der Expression dieser Untereinheiten auf mRNA-Ebene, jedoch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Der Nachweis von  $\cdot\text{O}_2^-$  durch die ESR-Spektroskopie war aufgrund der anti-oxidativen Kapazität des Myokardgewebes nicht möglich.

## 6 Literatur

- Adams, D.J., Barakeh, J., Laskey, R. and Van Breemen, C. (1989) Ion channels and regulation of intracellular calcium in vascular endothelial cells. *Faseb J*, **3**, 2389-2400.
- Ago, T., Nunoi, H., Ito, T. and Sumimoto, H. (1999) Mechanism for phosphorylation-induced activation of the phagocyte NADPH oxidase protein p47(phox). Triple replacement of serines 303, 304, and 328 with aspartates disrupts the SH3 domain-mediated intramolecular interaction in p47(phox), thereby activating the oxidase. *J Biol Chem*, **274**, 33644-33653.
- Alberts, G.F., Peifley, K.A., Johns, A., Kleha, J.F. and Winkles, J.A. (1994) Constitutive endothelin-1 overexpression promotes smooth muscle cell proliferation via an external autocrine loop. *J Biol Chem*, **269**, 10112-10118.
- Alvarez, B., Rubbo, H., Kirk, M., Barnes, S., Freeman, B.A. and Radi, R. (1996) Peroxynitrite-dependent tryptophan nitration. *Chem Res Toxicol*, **9**, 390-396.
- Aoki, T., Suzuki, Y., Nishio, K., Suzuki, K., Miyata, A., Oyamada, Y., Mori, M., Fujita, H. and Yamaguchi, K. (1997) Effect of antioxidants on hyperoxia-induced ICAM-1 expression in human endothelial cells. *Adv Exp Med Biol*, **411**, 503-511.
- Ardlie, N.G., Selley, M.L. and Simons, L.A. (1989) Platelet activation by oxidatively modified low density lipoproteins. *Atherosclerosis*, **76**, 117-124.
- Auge, N., Andrieu, N., Negre-Salvayre, A., Thiers, J.C., Levade, T. and Salvayre, R. (1996) The sphingomyelin-ceramide signaling pathway is involved in oxidized low density lipoprotein-induced cell proliferation. *J Biol Chem*, **271**, 19251-19255.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1997) Current protocols in molecular biology. *Greene Publishing Associates. J. Wiley and Sons, Inc. Brooklyn, N. Y. Media, PA.*
- Babior, B.M., Lambeth, J.D. and Nauseef, W. (2002) The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys*, **397**, 342-344.
- Banfi, B., Maturana, A., Jaconi, S., Arnaudeau, S., Laforge, T., Sinha, B., Ligeti, E., Demarex, N. and Krause, K.H. (2000) A mammalian H<sup>+</sup> channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOH-1. *Science*, **287**, 138-142.
- Banfi, B., Molnar, G., Maturana, A., Steger, K., Hegedus, B., Demarex, N. and Krause, K.H. (2001) A Ca<sup>2+</sup>-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol Chem*, **276**, 37594-37601.
- Barton, M., Haudenschild, C.C., d'Uscio, L.V., Shaw, S., Munter, K. and Luscher, T.F. (1998) Endothelin ETA receptor blockade restores NO-mediated endothelial function and inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 14367-14372.
- Berk, B.C., Duff, J.L., Marrero, M.B. and Bernstein, K.E. (1996) Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle. In: *Sowers, J. R., ed. Endocrinology of the Vasculature, Humana Press, Totowa, New Jersey*, 187-204.
- Bickel, P.E. and Freeman, M.W. (1992) Rabbit aortic smooth muscle cells express inducible macrophage scavenger receptor messenger RNA that is absent from endothelial cells. *J Clin Invest*, **90**, 1450-1457.
- Biggers, J.D. and McFeely, R.A. (1963) A simple method for the display of chromosomes from cultures of white blood cells with special reference of the ox. *Nature*, **199**, 718-719.
- Bishop, C., Rankine, D.M. and Talbott, J.H. (1959) The Nucleotides in Normal Human Blood. *J. Biol. Chem.*, **234**, 1233-1237.
- Bjorkerud, B. and Bjorkerud, S. (1996) Contrary effects of lightly and strongly oxidized LDL with potent promotion of growth versus apoptosis on arterial smooth muscle cells, macrophages, and fibroblasts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **16**, 416-424.

- Bolotina, V.M., Najibi, S., Palacino, J.J., Pagano, P.J. and Cohen, R.A. (1994) Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*, **368**, 850-853.
- Boo, Y.C., Hwang, J., Sykes, M., Michell, B.J., Kemp, B.E., Lum, H. and Jo, H. (2002a) Shear stress stimulates phosphorylation of eNOS at Ser(635) by a protein kinase A-dependent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **283**, H1819-1828.
- Boo, Y.C., Sorescu, G., Boyd, N., Shiojima, I., Walsh, K., Du, J. and Jo, H. (2002b) Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms: role of protein kinase A. *J Biol Chem*, **277**, 3388-3396.
- Bossaller, C., Habib, G.B., Yamamoto, H., Williams, C., Wells, S. and Henry, P.D. (1987) Impaired muscarinic endothelium-dependent relaxation and cyclic guanosine 5'-monophosphate formation in atherosclerotic human coronary artery and rabbit aorta. *J Clin Invest*, **79**, 170-174.
- Boulanger, C. and Luscher, T.F. (1990) Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest*, **85**, 587-590.
- Boulanger, C.M., Tanner, F.C., Bea, M.L., Hahn, A.W., Werner, A. and Luscher, T.F. (1992) Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circ Res*, **70**, 1191-1197.
- Brakemeier, S., Eichler, I., Hopp, H., Kohler, R. and Hoyer, J. (2002) Up-regulation of endothelial stretch-activated cation channels by fluid shear stress. *Cardiovasc Res*, **53**, 209-218.
- Bredt, D.S., Hwang, P.M., Glatt, C.E., Lowenstein, C., Reed, R.R. and Snyder, S.H. (1991) Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*, **351**, 714-718.
- Buga, G.M., Gold, M.E., Fukuto, J.M. and Ignarro, L.J. (1991) Shear stress-induced release of nitric oxide from endothelial cells grown on beads. *Hypertension*, **17**, 187-193.
- Busse, R. and Fleming, I. (1998) Pulsatile stretch and shear stress: physical stimuli determining the production of endothelium-derived relaxing factors. *J Vasc Res*, **35**, 73-84.
- Busse, R., Pohl, U. and Luckhoff, A. (1989) Mechanisms controlling the production of endothelial autacoids. *Z Kardiol*, **78**, 64-69.
- Callsen, D., Sandau, K.B. and Brune, B. (1999) Nitric oxide and superoxide inhibit platelet-derived growth factor receptor phosphotyrosine phosphatases. *Free Radic Biol Med*, **26**, 1544-1553.
- Campbell, D.J. and Habener, J.F. (1986) Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. *J Clin Invest*, **78**, 31-39.
- Chai, Y.C., Howe, P.H., DiCorleto, P.E. and Chisolm, G.M. (1996) Oxidized low density lipoprotein and lysophosphatidylcholine stimulate cell cycle entry in vascular smooth muscle cells. Evidence for release of fibroblast growth factor-2. *J Biol Chem*, **271**, 17791-17797.
- Chatterjee, S. and Ghosh, N. (1996) Oxidized low density lipoprotein stimulates aortic smooth muscle cell proliferation. *Glycobiology*, **6**, 303-311.
- Chen, M., Kakutani, M., Minami, M., Kataoka, H., Kume, N., Narumiya, S., Kita, T., Masaki, T. and Sawamura, T. (2000) Increased expression of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 in initial atherosclerotic lesions of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20**, 1107-1115.
- Chen, M., Kakutani, M., Naruko, T., Ueda, M., Narumiya, S., Masaki, T. and Sawamura, T. (2001) Activation-dependent surface expression of LOX-1 in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun*, **282**, 153-158.

- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J. and Rutter, W.J. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, **18**, 5294-5299.
- Chiu, J.J., Wung, B.S., Shyy, J.Y., Hsieh, H.J. and Wang, D.L. (1997) Reactive oxygen species are involved in shear stress-induced intercellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **17**, 3570-3577.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**, 156-159.
- Clark, R.A., Malech, H.L., Gallin, J.I., Nunoi, H., Volpp, B.D., Pearson, D.W., Nauseef, W.M. and Curnutte, J.T. (1989) Genetic variants of chronic granulomatous disease: prevalence of deficiencies of two cytosolic components of the NADPH oxidase system. *N Engl J Med*, **321**, 647-652.
- Clement, M.V. and Pervaiz, S. (1999) Reactive oxygen intermediates regulate cellular response to apoptotic stimuli: an hypothesis. *Free Radic Res*, **30**, 247-252.
- Cominacini, L., Rigoni, A., Pasini, A.F., Garbin, U., Davoli, A., Campagnola, M., Pastorino, A.M., Lo Cascio, V. and Sawamura, T. (2001) The binding of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) to ox-LDL receptor-1 reduces the intracellular concentration of nitric oxide in endothelial cells through an increased production of superoxide. *J Biol Chem*, **276**, 13750-13755.
- Corson, M.A., James, N.L., Latta, S.E., Nerem, R.M., Berk, B.C. and Harrison, D.G. (1996) Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res*, **79**, 984-991.
- Cross, A.R. (2000) p40(phox) Participates in the activation of NADPH oxidase by increasing the affinity of p47(phox) for flavocytochrome b(558). *Biochem J*, **349**, 113-117.
- Cross, A.R. and Jones, O.T. (1991) Enzymic mechanisms of superoxide production. *Biochim Biophys Acta*, **1057**, 281-298.
- Curnutte, J.T., Kuver, R. and Babior, B.M. (1987) Activation of the respiratory burst oxidase in a fully soluble system from human neutrophils. *J Biol Chem*, **262**, 6450-6452.
- Cushing, S.D., Berliner, J.A., Valente, A.J., Territo, M.C., Navab, M., Parhami, F., Gerrity, R., Schwartz, C.J. and Fogelman, A.M. (1990) Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 5134-5138.
- Davidson, C.A., Kaminski, P.M. and Wolin, M.S. (1997) NO elicits prolonged relaxation of bovine pulmonary arteries via endogenous peroxynitrite generation. *Am J Physiol*, **273**, L437-444.
- Davis, M.E., Cai, H., Drummond, G.R. and Harrison, D.G. (2001) Shear stress regulates endothelial nitric oxide synthase expression through c-Src by divergent signaling pathways. *Circ Res*, **89**, 1073-1080.
- De Deken, X., Wang, D., Many, M.C., Costagliola, S., Libert, F., Vassart, G., Dumont, J.E. and Miot, F. (2000) Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J Biol Chem*, **275**, 23227-23233.
- de Gasparo, M., Catt, K.J., Inagami, T., Wright, J.W. and Unger, T. (2000) International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*, **52**, 415-472.
- De Keulenaer, G.W., Chappell, D.C., Ishizaka, N., Nerem, R.M., Alexander, R.W. and Griendling, K.K. (1998) Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state: role of a superoxide-producing NADH oxidase. *Circ Res*, **82**, 1094-1101.

- de Nucci, G., Thomas, R., D'Orleans-Juste, P., Antunes, E., Walder, C., Warner, T.D. and Vane, J.R. (1988) Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 9797-9800.
- Deng, X., Marois, Y., How, T., Merhi, Y., King, M., Guidoin, R. and Karino, T. (1995a) Luminal surface concentration of lipoprotein (LDL) and its effect on the wall uptake of cholesterol by canine carotid arteries. *J Vasc Surg*, **21**, 135-145.
- Deng, X., Marois, Y., How, T., Merhi, Y., King, M., Guidoin, R. and Karino, T. (1995b) Luminal surface concentration of lipoprotein (LDL) and its effect on the wall uptake of cholesterol by canine carotid arteries. Erratum. *J Vasc Surg*, **22**, 648.
- Diamond, S.L., Sharefkin, J.B., Dieffenbach, C., Frasier-Scott, K., McIntire, L.V. and Eskin, S.G. (1990) Tissue plasminogen activator messenger RNA levels increase in cultured human endothelial cells exposed to laminar shear stress. *J Cell Physiol*, **143**, 364-371.
- Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R. and Zeiher, A.M. (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, **399**, 601-605.
- Dimmeler, S., Haendeler, J., Galle, J. and Zeiher, A.M. (1997) Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP32-like proteases. A mechanistic clue to the 'response to injury' hypothesis. *Circulation*, **95**, 1760-1763.
- Dinauer, M.C., Orkin, S.H., Brown, R., Jesaitis, A.J. and Parkos, C.A. (1987) The glycoprotein encoded by the X-linked chronic granulomatous disease locus is a component of the neutrophil cytochrome b complex. *Nature*, **327**, 717-720.
- Dohi, Y., Hahn, A.W., Boulanger, C.M., Buhler, F.R. and Luscher, T.F. (1992) Endothelin stimulated by angiotensin II augments contractility of spontaneously hypertensive rat resistance arteries. *Hypertension*, **19**, 131-137.
- Drake, T.A., Hannani, K., Fei, H.H., Lavi, S. and Berliner, J.A. (1991) Minimally oxidized low-density lipoprotein induces tissue factor expression in cultured human endothelial cells. *Am J Pathol*, **138**, 601-607.
- Duerrschmidt, N., Wippich, N., Goettsch, W., Broemme, H.J. and Morawietz, H. (2000) Endothelin-1 induces NAD(P)H oxidase in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **269**, 713-717.
- Dupuy, C., Ohayon, R., Valent, A., Noel-Hudson, M.S., Deme, D. and Virion, A. (1999) Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cdnas. *J Biol Chem*, **274**, 37265-37269.
- d'Uscio, L.V., Barton, M., Shaw, S. and Luscher, T.F. (2000) Endothelin in atherosclerosis: importance of risk factors and therapeutic implications. *J Cardiovasc Pharmacol*, **35**, S55-59.
- Dzau, V.J. (1993) Local expression and pathophysiological role of renin-angiotensin in the blood vessels and heart. *Basic Res Cardiol*, **88**, 1-14.
- Ebert, B.L. and Bunn, H.F. (1999) Regulation of the erythropoietin gene. *Blood*, **94**, 1864-1877.
- el Benna, J., Faust, L.P. and Babior, B.M. (1994) The phosphorylation of the respiratory burst oxidase component p47phox during neutrophil activation. Phosphorylation of sites recognized by protein kinase C and by proline-directed kinases. *J Biol Chem*, **269**, 23431-23436.
- Emori, T., Hirata, Y., Ohta, K., Kanno, K., Eguchi, S., Imai, T., Shichiri, M. and Marumo, F. (1991) Cellular mechanism of endothelin-1 release by angiotensin and vasopressin. *Hypertension*, **18**, 165-170.

- Fineschi, V., Baroldi, G., Centini, F., Cerretani, D., Fiaschi, A.I., Micheli, L., Parolini, M., Turillazzi, E. and Giorgi, G. (2001) Markers of cardiac oxidative stress and altered morphology after intraperitoneal cocaine injection in a rat model. *Int J Legal Med*, **114**, 323-330.
- Fisslthaler, B., Dimmeler, S., Hermann, C., Busse, R. and Fleming, I. (2000) Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress. *Acta Physiol Scand*, **168**, 81-88.
- Flather, M.D., Yusuf, S., Kober, L., Pfeffer, M., Hall, A., Murray, G., Torp-Pedersen, C., Ball, S., Pogue, J., Moye, L. and Braunwald, E. (2000) Long-term ACE-inhibitor therapy in patients with heart failure or left-ventricular dysfunction: a systematic overview of data from individual patients. ACE-Inhibitor Myocardial Infarction Collaborative Group. *Lancet*, **355**, 1575-1581.
- Forster, E. (1994) An improved general method to generate internal standards for competitive PCR. *Biotechniques*, **16**, 18-20.
- Forstermann, U., Mugge, A., Alheid, U., Haverich, A. and Frolich, J.C. (1988) Selective attenuation of endothelium-mediated vasodilation in atherosclerotic human coronary arteries. *Circ Res*, **62**, 185-190.
- Freeman, B.A. and Crapo, J.D. (1982) Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest*, **47**, 412-426.
- Freeman, M.W. (1997) Scavenger receptors in atherosclerosis. *Curr Opin Hematol*, **4**, 41-47.
- Fukui, T., Yoshiyama, M., Hanatani, A., Omura, T., Yoshikawa, J. and Abe, Y. (2001) Expression of p22-phox and gp91-phox, essential components of NADPH oxidase, increases after myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun*, **281**, 1200-1206.
- Fyhrquist, F., Metsarinne, K. and Tikkanen, I. (1995) Role of angiotensin II in blood pressure regulation and in the pathophysiology of cardiovascular disorders. *J Hum Hypertens*, **9 Suppl 5**, S19-24.
- Galle, J., Bengen, J., Schollmeyer, P. and Wanner, C. (1995) Impairment of endothelium-dependent dilation in rabbit renal arteries by oxidized lipoprotein(a). Role of oxygen-derived radicals. *Circulation*, **92**, 1582-1589.
- Galle, J. and Wanner, C. (1998) Oxidized LDL and Lp(a). Preparation, modification, and analysis. *Methods Mol Biol*, **108**, 119-130.
- Garcia, J.G., Davis, H.W. and Patterson, C.E. (1995) Regulation of endothelial cell gap formation and barrier dysfunction: role of myosin light chain phosphorylation. *J Cell Physiol*, **163**, 510-522.
- Garg, R. and Yusuf, S. (1995) Overview of randomized trials of angiotensin-converting enzyme inhibitors on mortality and morbidity in patients with heart failure. Collaborative Group on ACE Inhibitor Trials. *Jama*, **273**, 1450-1456.
- Garg, U.C. and Hassid, A. (1989) Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest*, **83**, 1774-1777.
- Geiger, R.V., Berk, B.C., Alexander, R.W. and Nerem, R.M. (1992) Flow-induced calcium transients in single endothelial cells: spatial and temporal analysis. *Am J Physiol*, **262**, C1411-1417.
- Geiszt, M., Kopp, J.B., Varnai, P. and Leto, T.L. (2000) Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 8010-8014.
- Griendling, K.K., Minieri, C.A., Ollerenshaw, J.D. and Alexander, R.W. (1994) Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, **74**, 1141-1148.
- Grune, T., Blasig, I.E., Sitte, N., Roloff, B., Haseloff, R. and Davies, K.J. (1998) Peroxynitrite increases the degradation of aconitase and other cellular proteins by proteasome. *J Biol Chem*, **273**, 10857-10862.

- Gryglewski, R.J., Palmer, R.M. and Moncada, S. (1986) Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*, **320**, 454-456.
- Han, C.H., Freeman, J.L., Lee, T., Motalebi, S.A. and Lambeth, J.D. (1998a) Regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase. Identification of an activation domain in p67(phox). *J Biol Chem*, **273**, 16663-16668.
- Han, K.H., Tangirala, R.K., Green, S.R. and Quehenberger, O. (1998b) Chemokine receptor CCR2 expression and monocyte chemoattractant protein-1-mediated chemotaxis in human monocytes. A regulatory role for plasma LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **18**, 1983-1991.
- Heinroth-Hoffmann, I., Vogelsang, M., Schiewe, P., Morawietz, H., Holtz, J., Ponicke, K. and Brodde, O.E. (1998) Mechanism of ET(A)-receptor stimulation-induced increases in intracellular Ca<sup>2+</sup> in SK-N-MC cells. *Br J Pharmacol*, **125**, 1202-1211.
- Hoyer, J., Kohler, R. and Distler, A. (1997) Mechanosensitive cation channels in aortic endothelium of normotensive and hypertensive rats. *Hypertension*, **30**, 112-119.
- Hoyer, J., Kohler, R. and Distler, A. (1998) Mechanosensitive Ca<sup>2+</sup> oscillations and STOC activation in endothelial cells. *Faseb J*, **12**, 359-366.
- Huang, J., Hitt, N.D. and Kleinberg, M.E. (1995) Stoichiometry of p22-phox and gp91-phox in phagocyte cytochrome b558. *Biochemistry*, **34**, 16753-16757.
- Ischiropoulos, H., Zhu, L., Chen, J., Tsai, M., Martin, J.C., Smith, C.D. and Beckman, J.S. (1992) Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys*, **298**, 431-437.
- Jaffe, E.A., Nachman, R.L., Becker, C.G. and Minick, C.R. (1973) Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest*, **52**, 2745-2756.
- Jen, C.J., Jhiang, S.J. and Chen, H.I. (2000) Invited review: effects of flow on vascular endothelial intracellular calcium signaling of rat aortas ex vivo. *J Appl Physiol*, **89**, 1657-1662; discussion 1656.
- Jones, S.A., O'Donnell, V.B., Wood, J.D., Broughton, J.P., Hughes, E.J. and Jones, O.T. (1996) Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. *Am J Physiol*, **271**, H1626-1634.
- Jones, S.A., Wood, J.D., Coffey, M.J. and Jones, O.T. (1994) The functional expression of p47-phox and p67-phox may contribute to the generation of superoxide by an NADPH oxidase-like system in human fibroblasts. *FEBS Lett*, **355**, 178-182.
- Kataoka, H., Kume, N., Miyamoto, S., Minami, M., Morimoto, M., Hayashida, K., Hashimoto, N. and Kita, T. (2001) Oxidized LDL modulates Bax/Bcl-2 through the lectinlike Ox-LDL receptor-1 in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **21**, 955-960.
- Kataoka, H., Kume, N., Miyamoto, S., Minami, M., Moriwaki, H., Murase, T., Sawamura, T., Masaki, T., Hashimoto, N. and Kita, T. (1999) Expression of lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in human atherosclerotic lesions. *Circulation*, **99**, 3110-3117.
- Kawai, Y., Matsumoto, Y., Ikeda, Y. and Watanabe, K. (1997) [Regulation of antithrombogenicity in endothelium by hemodynamic forces]. *Rinsho Byori*, **45**, 315-320.
- Kehrer, J.P. (1993) Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol*, **23**, 21-48.
- Khan, B.V., Harrison, D.G., Olbrych, M.T., Alexander, R.W. and Medford, R.M. (1996) Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 9114-9119.

- Khan, B.V., Parthasarathy, S.S., Alexander, R.W. and Medford, R.M. (1995) Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine- activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest*, **95**, 1262-1270.
- Kikuchi, H., Hikage, M., Miyashita, H. and Fukumoto, M. (2000) NADPH oxidase subunit, gp91(phox) homologue, preferentially expressed in human colon epithelial cells. *Gene*, **254**, 237-243.
- Kita, T. (1999) LOX-1, a possible clue to the missing link between hypertension and atherogenesis. *Circ Res*, **84**, 1113-1115.
- Kohler, R., Distler, A. and Hoyer, J. (1999) Increased mechanosensitive currents in aortic endothelial cells from genetically hypertensive rats. *J Hypertens*, **17**, 365-371.
- Kosower, N.S. and Kosower, E.M. (1978) The glutathione status of cells. *Int Rev Cytol*, **54**, 109-160.
- Kowala, M.C., Rose, P.M., Stein, P.D., Goller, N., Recce, R., Beyer, S., Valentine, M., Barton, D. and Durham, S.K. (1995) Selective blockade of the endothelin subtype A receptor decreases early atherosclerosis in hamsters fed cholesterol. *Am J Pathol*, **146**, 819-826.
- Kuchan, M.J. and Frangos, J.A. (1993) Shear stress regulates endothelin-1 release via protein kinase C and cGMP in cultured endothelial cells. *Am J Physiol*, **264**, H150-156.
- Kuchan, M.J. and Frangos, J.A. (1994) Role of calcium and calmodulin in flow-induced nitric oxide production in endothelial cells. *Am J Physiol*, **266**, C628-636.
- Kugiyama, K., Kerns, S.A., Morrisett, J.D., Roberts, R. and Henry, P.D. (1990) Impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by lysolecithin in modified low-density lipoproteins. *Nature*, **344**, 160-162.
- Kume, N., Cybulsky, M.I. and Gimbrone, M.A., Jr. (1992) Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Invest*, **90**, 1138-1144.
- Kusuhara, M., Chait, A., Cader, A. and Berk, B.C. (1997) Oxidized LDL stimulates mitogen-activated protein kinases in smooth muscle cells and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **17**, 141-148.
- Lagrange, P., Romero, I.A., Minn, A. and Revest, P.A. (1999) Transendothelial permeability changes induced by free radicals in an in vitro model of the blood-brain barrier. *Free Radic Biol Med*, **27**, 667-672.
- Lambeth, J.D., Cheng, G., Arnold, R.S. and Edens, W.A. (2000) Novel homologs of gp91phox. *Trends Biochem Sci*, **25**, 459-461.
- Lansman, J.B., Hallam, T.J. and Rink, T.J. (1987) Single stretch-activated ion channels in vascular endothelial cells as mechanotransducers? *Nature*, **325**, 811-813.
- Laufs, U., La Fata, V., Plutzky, J. and Liao, J.K. (1998) Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation*, **97**, 1129-1135.
- Lehr, H.A., Becker, M., Marklund, S.L., Hubner, C., Arfors, K.E., Kohlschutter, A. and Messmer, K. (1992) Superoxide-dependent stimulation of leukocyte adhesion by oxidatively modified LDL in vivo. *Arterioscler Thromb*, **12**, 824-829.
- Lerman, A., Edwards, B.S., Hallett, J.W., Heublein, D.M., Sandberg, S.M. and Burnett, J.C., Jr. (1991) Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N Engl J Med*, **325**, 997-1001.
- Lerman, A., Holmes, D.R., Jr., Bell, M.R., Garratt, K.N., Nishimura, R.A. and Burnett, J.C., Jr. (1995) Endothelin in coronary endothelial dysfunction and early atherosclerosis in humans. *Circulation*, **92**, 2426-2431.

- Leusen, J.H., Verhoeven, A.J. and Roos, D. (1996) Interactions between the components of the human NADPH oxidase: intrigues in the phox family. *J Lab Clin Med*, **128**, 461-476.
- Li, D. and Mehta, J.L. (2000) Upregulation of endothelial receptor for oxidized LDL (LOX-1) by oxidized LDL and implications in apoptosis of human coronary artery endothelial cells: evidence from use of antisense LOX-1 mRNA and chemical inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20**, 1116-1122.
- Li, D.Y., Chen, H.J. and Mehta, J.L. (2001a) Statins inhibit oxidized-LDL-mediated LOX-1 expression, uptake of oxidized-LDL and reduction in PKB phosphorylation. *Cardiovasc Res*, **52**, 130-135.
- Li, D.Y., Zhang, Y.C., Philips, M.I., Sawamura, T. and Mehta, J.L. (1999) Upregulation of endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein (LOX-1) in cultured human coronary artery endothelial cells by angiotensin II type 1 receptor activation. *Circ Res*, **84**, 1043-1049.
- Li, J.M., Mullen, A.M. and Shah, A.M. (2001b) Phenotypic properties and characteristics of superoxide production by mouse coronary microvascular endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol*, **33**, 1119-1131.
- Liersch, M., Groteluschen, H. and Decker, K. (1971) [NAD permeation into the liver cell]. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, **352**, 267-274.
- Lincoln, T.M., Komalavilas, P. and Cornwell, T.L. (1994) Pleiotropic regulation of vascular smooth muscle tone by cyclic GMP- dependent protein kinase. *Hypertension*, **23**, 1141-1147.
- Lindpaintner, K., Jin, M.W., Niedermaier, N., Wilhelm, M.J. and Ganten, D. (1990) Cardiac angiotensinogen and its local activation in the isolated perfused beating heart. *Circ Res*, **67**, 564-573.
- Liochev, S.I. and Fridovich, I. (1997) Lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a mediator of superoxide anion production. *Arch Biochem Biophys*, **337**, 115-120.
- Liu, H., Xiong, Z. and Sperelakis, N. (1997) Cyclic nucleotides regulate the activity of L-type calcium channels in smooth muscle cells from rat portal vein. *J Mol Cell Cardiol*, **29**, 1411-1421.
- Liu, S.M. and Sundqvist, T. (1995) Effects of hydrogen peroxide and phorbol myristate acetate on endothelial transport and F-actin distribution. *Exp Cell Res*, **217**, 1-7.
- Lucas, M. and Solano, F. (1992) Coelenterazine is a superoxide anion-sensitive chemiluminescent probe: its usefulness in the assay of respiratory burst in neutrophils. *Anal Biochem*, **206**, 273-277.
- Lüscher, T.F. and Vanhoutte, P.M. (1990) The endothelium: modulator of cardiovascular function. Boca Raton, FL: CRC Press. 1-215.
- Lusis, A.J. (2000) Atherosclerosis. *Nature*, **407**, 233-241.
- Lynn, S., Gurr, J.R., Lai, H.T. and Jan, K.Y. (2000) NADH oxidase activation is involved in arsenite-induced oxidative DNA damage in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, **86**, 514-519.
- Maki, S., Miyauchi, T., Sakai, S., Kobayashi, T., Maeda, S., Takata, Y., Sugiyama, F., Fukamizu, A., Murakami, K., Goto, K. and Sugishita, Y. (1998) Endothelin-1 expression in hearts of transgenic hypertensive mice overexpressing angiotensin II. *J Cardiovasc Pharmacol*, **31**, S412-416.
- Malek, A. and Izumo, S. (1992) Physiological fluid shear stress causes downregulation of endothelin-1 mRNA in bovine aortic endothelium. *Am J Physiol*, **263**, C389-396.
- Marchenko, S.M. and Sage, S.O. (2000) Hyperosmotic but not hyposmotic stress evokes a rise in cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration in endothelium of intact rat aorta. *Exp Physiol*, **85**, 151-157.

- Marsden, P.A., Schappert, K.T., Chen, H.S., Flowers, M., Sundell, C.L., Wilcox, J.N., Lamas, S. and Michel, T. (1992) Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett*, **307**, 287-293.
- Mehta, J.L. and Li, D. (2002) Identification, regulation and function of a novel lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor. *J Am Coll Cardiol*, **39**, 1429-1435.
- Meier, B., Cross, A.R., Hancock, J.T., Kaup, F.J. and Jones, O.T. (1991) Identification of a superoxide-generating NADPH oxidase system in human fibroblasts. *Biochem J*, **275**, 241-245.
- Michel, T. and Feron, O. (1997) Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest*, **100**, 2146-2152.
- Miyauchi, T. and Masaki, T. (1999) Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol*, **61**, 391-415.
- Mo, M., Eskin, S.G. and Schilling, W.P. (1991) Flow-induced changes in Ca<sup>2+</sup> signaling of vascular endothelial cells: effect of shear stress and ATP. *Am J Physiol*, **260**, H1698-1707.
- Mohazzab, K.M., Kaminski, P.M. and Wolin, M.S. (1994) NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am J Physiol*, **266**, H2568-2572.
- Mohazzab, K.M. and Wolin, M.S. (1994) Properties of a superoxide anion-generating microsomal NADH oxidoreductase, a potential pulmonary artery PO<sub>2</sub> sensor. *Am J Physiol*, **267**, L823-831.
- Morawietz, H., Rueckschloss, U., Niemann, B., Duerrschmidt, N., Galle, J., Hakim, K., Zerkowski, H.R., Sawamura, T. and Holtz, J. (1999) Angiotensin II induces LOX-1, the human endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Circulation*, **100**, 899-902.
- Morawietz, H., Talanow, R., Szibor, M., Rueckschloss, U., Schubert, A., Bartling, B., Darmer, D. and Holtz, J. (2000) Regulation of the endothelin system by shear stress in human endothelial cells. *J Physiol*, **525 Pt 3**, 761-770.
- Moreau, P., d'Uscio, L.V., Shaw, S., Takase, H., Barton, M. and Luscher, T.F. (1997) Angiotensin II increases tissue endothelin and induces vascular hypertrophy: reversal by ET(A)-receptor antagonist. *Circulation*, **96**, 1593-1597.
- Mullis, K.B. and Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, **155**, 335-350.
- Munzel, T., Li, H., Mollnau, H., Hink, U., Matheis, E., Hartmann, M., Oelze, M., Skatchkov, M., Warnholtz, A., Duncker, L., Meinertz, T. and Forstermann, U. (2000) Effects of long-term nitroglycerin treatment on endothelial nitric oxide synthase (NOS III) gene expression, NOS III-mediated superoxide production, and vascular NO bioavailability. *Circ Res*, **86**, E7-E12.
- Murase, T., Kume, N., Korenaga, R., Ando, J., Sawamura, T., Masaki, T. and Kita, T. (1998) Fluid shear stress transcriptionally induces lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells. *Circ Res*, **83**, 328-333.
- Nagase, M., Hirose, S., Sawamura, T., Masaki, T. and Fujita, T. (1997) Enhanced expression of endothelial oxidized low-density lipoprotein receptor (LOX-1) in hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun*, **237**, 496-498.
- Nahmias, C. and Strosberg, A.D. (1995) The angiotensin AT<sub>2</sub> receptor: searching for signal-transduction pathways and physiological function. *Trends Pharmacol Sci*, **16**, 223-225.
- Naruse, K. and Sokabe, M. (1993) Involvement of stretch-activated ion channels in Ca<sup>2+</sup> mobilization to mechanical stretch in endothelial cells. *Am J Physiol*, **264**, C1037-1044.

- Niebauer, J., Tsao, P.S., Lin, P.S., Pratt, R.E. and Cooke, J.P. (2001) Cholesterol-induced upregulation of angiotensin II and its effects on monocyte-endothelial interaction and superoxide production. *Vasc Med*, **6**, 133-138.
- Nishida, K., Harrison, D.G., Navas, J.P., Fisher, A.A., Dockery, S.P., Uematsu, M., Nerem, R.M., Alexander, R.W. and Murphy, T.J. (1992) Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J Clin Invest*, **90**, 2092-2096.
- Nisimoto, Y., Motalebi, S., Han, C.H. and Lambeth, J.D. (1999) The p67(phox) activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b(558). *J Biol Chem*, **274**, 22999-23005.
- Nunoi, H., Rotrosen, D., Gallin, J.I. and Malech, H.L. (1988) Two forms of autosomal chronic granulomatous disease lack distinct neutrophil cytosol factors. *Science*, **242**, 1298-1301.
- Offermann, M.K. and Medford, R.M. (1994) Antioxidants and atherosclerosis: a molecular perspective. *Heart Dis Stroke*, **3**, 52-57.
- Ogawa, Y., Nakao, K., Arai, H., Nakagawa, O., Hosoda, K., Suga, S., Nakanishi, S. and Imura, H. (1991) Molecular cloning of a non-isopeptide-selective human endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, **178**, 248-255.
- Padmaja, S., Ramezani, M.S., Bounds, P.L. and Koppenol, W.H. (1996) Reaction of peroxynitrite with L-tryptophan. *Redox Rep*, **2**, 173-177.
- Padmaja, S., Squadrito, G.L. and Pryor, W.A. (1998) Inactivation of glutathione peroxidase by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys*, **349**, 1-6.
- Pagano, P.J., Clark, J.K., Cifuentes-Pagano, M.E., Clark, S.M., Callis, G.M. and Quinn, M.T. (1997) Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 14483-14488.
- Pryor, W.A., Jin, X. and Squadrito, G.L. (1994) One- and two-electron oxidations of methionine by peroxynitrite. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 11173-11177.
- Pryor, W.A. and Squadrito, G.L. (1995) The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol*, **268**, L699-722.
- Quijano, C., Hernandez-Saavedra, D., Castro, L., McCord, J.M., Freeman, B.A. and Radi, R. (2001) Reaction of peroxynitrite with Mn-superoxide dismutase. Role of the metal center in decomposition kinetics and nitration. *J Biol Chem*, **276**, 11631-11638.
- Radomski, M.W., Palmer, R.M. and Moncada, S. (1987) Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br J Pharmacol*, **92**, 181-187.
- Rajagopalan, S., Kurz, S., Munzel, T., Tarpey, M., Freeman, B.A., Griending, K.K. and Harrison, D.G. (1996) Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest*, **97**, 1916-1923.
- Rajavashisth, T.B., Andalibi, A., Territo, M.C., Berliner, J.A., Navab, M., Fogelman, A.M. and Lusis, A.J. (1990) Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature*, **344**, 254-257.
- Reeves, E.P., Lu, H., Jacobs, H.L., Messina, C.G., Bolsover, S., Gabella, G., Potma, E.O., Warley, A., Roes, J. and Segal, A.W. (2002) Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K<sup>+</sup> flux. *Nature*, **416**, 291-297.
- Rieder, M.J., Carmona, R., Krieger, J.E., Pritchard, K.A., Jr. and Greene, A.S. (1997) Suppression of angiotensin-converting enzyme expression and activity by shear stress. *Circ Res*, **80**, 312-319.
- Ross, R. (1995) Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol*, **57**, 791-804.

- Ross, R. (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, **340**, 115-126.
- Rossi, G.P., Sacchetto, A., Cesari, M. and Pessina, A.C. (1999) Interactions between endothelin-1 and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Cardiovasc Res*, **43**, 300-307.
- Royer-Pokora, B., Kunkel, L.M., Monaco, A.P., Goff, S.C., Newburger, P.E., Baehner, R.L., Cole, F.S., Curnutte, J.T. and Orkin, S.H. (1986) Cloning the gene for an inherited human disorder--chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location. *Nature*, **322**, 32-38.
- Rubanyi, G.M., Romero, J.C. and Vanhoutte, P.M. (1986) Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol*, **250**, H1145-1149.
- Rueckschloss, U. (2001) Pro-arteriosklerotische Induktion der Superoxidation-bildenden NADPH-Oxidase durch oxidativ modifiziertes "low density"-Lipoprotein und Angiotensin II in humanen Endothelzellen. *Dissertation*.
- Rueckschloss, U., Galle, J., Holtz, J., Zerkowski, H.R. and Morawietz, H. (2001) Induction of NAD(P)H oxidase by oxidized low-density lipoprotein in human endothelial cells: antioxidative potential of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor therapy. *Circulation*, **104**, 1767-1772.
- Rueckschloss, U., Quinn, M.T., Holtz, J. and Morawietz, H. (2002) Dose-Dependent Regulation of NAD(P)H Oxidase Expression by Angiotensin II in Human Endothelial Cells: Protective Effect of Angiotensin II Type 1 Receptor Blockade in Patients With Coronary Artery Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **22**, 1845-1851.
- Salinovich, O. and Montelaro, R.C. (1986) Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem*, **156**, 341-347.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbour, N. Y.*
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Sathyamoorthy, M., de Mendez, I., Adams, A.G. and Leto, T.L. (1997) p40(phox) down-regulates NADPH oxidase activity through interactions with its SH3 domain. *J Biol Chem*, **272**, 9141-9146.
- Sawamura, T., Kume, N., Aoyama, T., Moriwaki, H., Hoshikawa, H., Aiba, Y., Tanaka, T., Miwa, S., Katsura, Y., Kita, T. and Masaki, T. (1997) An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature*, **386**, 73-77.
- Schiffrin, E.L. and Touyz, R.M. (1998) Vascular biology of endothelin. *J Cardiovasc Pharmacol*, **32**, S2-13.
- Schubert, A., Cattaruzza, M., Hecker, M., Darmer, D., Holtz, J. and Morawietz, H. (2000) Shear stress-dependent regulation of the human beta-tubulin folding cofactor D gene. *Circ Res*, **87**, 1188-1194.
- Sdougos, H.P., Bussolari, S.R. and Dewey, C.F.J. (1984) Secondary flow and turbulence in a cone-plate device. *J Fluid Mech*, **138**, 379-404.
- Segal, A.W. and Shatwell, K.P. (1997) The NADPH oxidase of phagocytic leukocytes. *Ann N Y Acad Sci*, **832**, 215-222.
- Sellke, F.W., Armstrong, M.L. and Harrison, D.G. (1990) Endothelium-dependent vascular relaxation is abnormal in the coronary microcirculation of atherosclerotic primates. *Circulation*, **81**, 1586-1593.
- Sharefkin, J.B., Diamond, S.L., Eskin, S.G., McIntire, L.V. and Dieffenbach, C.W. (1991) Fluid flow decreases preendothelin mRNA levels and suppresses endothelin-1 peptide release in cultured human endothelial cells. *J Vasc Surg*, **14**, 1-9.

- Shimokawa, H. and Vanhoutte, P.M. (1989) Impaired endothelium-dependent relaxation to aggregating platelets and related vasoactive substances in porcine coronary arteries in hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Circ Res*, **64**, 900-914.
- Shiose, A., Kuroda, J., Tsuruya, K., Hirai, M., Hirakata, H., Naito, S., Hattori, M., Sakaki, Y. and Sumimoto, H. (2001) A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney. *J Biol Chem*, **276**, 1417-1423.
- Smith, R.M. and Curnutte, J.T. (1991) Molecular basis of chronic granulomatous disease. *Blood*, **77**, 673-686.
- Sorescu, D., Somers, M.J., Lassegue, B., Grant, S., Harrison, D.G. and Griendling, K.K. (2001) Electron spin resonance characterization of the NAD(P)H oxidase in vascular smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med*, **30**, 603-612.
- Sorescu, D., Weiss, D., Lassegue, B., Clempus, R.E., Szocs, K., Sorescu, G.P., Valppu, L., Quinn, M.T., Lambeth, J.D., Vega, J.D., Taylor, W.R. and Griendling, K.K. (2002) Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation*, **105**, 1429-1435.
- Steinbrecher, U.P. (1999) Receptors for oxidized low density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta*, **1436**, 279-298.
- Steinbrecher, U.P., Parthasarathy, S., Leake, D.S., Witztum, J.L. and Steinberg, D. (1984) Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 3883-3887.
- Stephan, Z.F. and Yurachek, E.C. (1993) Rapid fluorometric assay of LDL receptor activity by DiI-labeled LDL. *J Lipid Res*, **34**, 325-330.
- Suh, Y.A., Arnold, R.S., Lassegue, B., Shi, J., Xu, X., Sorescu, D., Chung, A.B., Griendling, K.K. and Lambeth, J.D. (1999) Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature*, **401**, 79-82.
- Sun, D., Huang, A., Sharma, S., Koller, A. and Kaley, G. (2001) Endothelial microtubule disruption blocks flow-dependent dilation of arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **280**, H2087-2093.
- Takakura, K., Beckman, J.S., MacMillan-Crow, L.A. and Crow, J.P. (1999) Rapid and irreversible inactivation of protein tyrosine phosphatases PTP1B, CD45, and LAR by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys*, **369**, 197-207.
- Tamura, K., Umemura, S., Nyui, N., Hibi, K., Ishigami, T., Kihara, M., Toya, Y. and Ishii, M. (1998) Activation of angiotensinogen gene in cardiac myocytes by angiotensin II and mechanical stretch. *Am J Physiol*, **275**, R1-9.
- Tang, X., Downes, C.P., Whetton, A.D. and Owen-Lynch, P.J. (2000) Role of phosphatidylinositol 3-kinase and specific protein kinase B isoforms in the suppression of apoptosis mediated by the Abelson protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem*, **275**, 13142-13148.
- Tarpey, M.M., White, C.R., Suarez, E., Richardson, G., Radi, R. and Freeman, B.A. (1999) Chemiluminescent detection of oxidants in vascular tissue. Lucigenin but not coelenterazine enhances superoxide formation. *Circ Res*, **84**, 1203-1211.
- Teahan, C., Rowe, P., Parker, P., Totty, N. and Segal, A.W. (1987) The X-linked chronic granulomatous disease gene codes for the beta- chain of cytochrome b-245. *Nature*, **327**, 720-721.
- Traub, O. and Berk, B.C. (1998) Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **18**, 677-685.
- Tsutsui, H., Ide, T., Hayashidani, S., Kinugawa, S., Suematsu, N., Utsumi, H. and Takeshita, A. (2001) Effects of ACE inhibition on left ventricular failure and oxidative stress in Dahl salt-sensitive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, **37**, 725-733.

- Tummala, P.E., Chen, X.L. and Medford, R.M. (2000) NF- kappa B independent suppression of endothelial vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 gene expression by inhibition of flavin binding proteins and superoxide production. *J Mol Cell Cardiol*, **32**, 1499-1508.
- Uematsu, M., Ohara, Y., Navas, J.P., Nishida, K., Murphy, T.J., Alexander, R.W., Nerem, R.M. and Harrison, D.G. (1995) Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am J Physiol*, **269**, C1371-1378.
- Uhlinger, D.J., Tyagi, S.R., Inge, K.L. and Lambeth, J.D. (1993) The respiratory burst oxidase of human neutrophils. Guanine nucleotides and arachidonate regulate the assembly of a multicomponent complex in a semirecombinant cell-free system. *J Biol Chem*, **268**, 8624-8631.
- Umeki, S. (1994) Mechanisms for the activation/electron transfer of neutrophil NADPH-oxidase complex and molecular pathology of chronic granulomatous disease. *Ann Hematol*, **68**, 267-277.
- Unger, T. (1999) The angiotensin type 2 receptor: variations on an enigmatic theme. *J Hypertens*, **17**, 1775-1786.
- Ushio-Fukai, M., Zafari, A.M., Fukui, T., Ishizaka, N. and Griendling, K.K. (1996) p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, **271**, 23317-23321.
- Vasquez-Vivar, J., Hogg, N., Pritchard, K.A., Jr., Martasek, P. and Kalyanaraman, B. (1997) Superoxide anion formation from lucigenin: an electron spin resonance spin-trapping study. *FEBS Lett*, **403**, 127-130.
- Volpp, B.D., Nauseef, W.M. and Clark, R.A. (1988) Two cytosolic neutrophil oxidase components absent in autosomal chronic granulomatous disease. *Science*, **242**, 1295-1297.
- Wada, H., Kaneko, T., Wakita, Y., Minamikawa, K., Nagaya, S., Tamaki, S., Deguchi, K. and Shirakawa, S. (1994) Effect of lipoproteins on tissue factor activity and PAI-II antigen in human monocytes and macrophages. *Int J Cardiol*, **47**, S21-25.
- Wagner, O.F., Christ, G., Wojta, J., Vierhapper, H., Parzer, S., Nowotny, P.J., Schneider, B., Waldhausl, W. and Binder, B.R. (1992) Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *J Biol Chem*, **267**, 16066-16068.
- Wallach, T.M. and Segal, A.W. (1996) Stoichiometry of the subunits of flavocytochrome b558 of the NADPH oxidase of phagocytes. *Biochem J*, **320**, 33-38.
- Wang, G.P., Deng, Z.D., Ni, J. and Qu, Z.L. (1997) Oxidized low density lipoprotein and very low density lipoprotein enhance expression of monocyte chemoattractant protein-1 in rabbit peritoneal exudate macrophages. *Atherosclerosis*, **133**, 31-36.
- Wingler, K., Wunsch, S., Kreutz, R., Rothermund, L., Paul, M. and Schmidt, H.H. (2001) Upregulation of the vascular NAD(P)H-oxidase isoforms Nox1 and Nox4 by the renin-angiotensin system in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med*, **31**, 1456-1464.
- Witztum, J.L. and Steinberg, D. (1991) Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest*, **88**, 1785-1792.
- Wolf, G. (2000) Free radical production and angiotensin. *Curr Hypertens Rep*, **2**, 167-173.
- Wolin, M.S., Hintze, T.H., Shen, W., Mohazzab, H.K. and Xie, Y.W. (1997) Involvement of reactive oxygen and nitrogen species in signalling mechanisms that control tissue respiration in muscle. *Biochem Soc Trans*, **25**, 934-939.
- Wood, J.G., Johnson, J.S., Mattioli, L.F. and Gonzalez, N.C. (2000) Systemic hypoxia increases leukocyte emigration and vascular permeability in conscious rats. *J Appl Physiol*, **89**, 1561-1568.

- Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K. and Masaki, T. (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, **332**, 411-415.
- Yin, H.L., Hartwig, J.H., Maruyama, K. and Stossel, T.P. (1981) Ca<sup>2+</sup> control of actin filament length. Effects of macrophage gelsolin on actin polymerization. *J Biol Chem*, **256**, 9693-9697.
- Yoshida, H., Kondratenko, N., Green, S., Steinberg, D. and Quehenberger, O. (1998a) Identification of the lectin-like receptor for oxidized low-density lipoprotein in human macrophages and its potential role as a scavenger receptor. *Biochem J*, **334**, 9-13.
- Yoshida, H., Quehenberger, O., Kondratenko, N., Green, S. and Steinberg, D. (1998b) Minimally oxidized low-density lipoprotein increases expression of scavenger receptor A, CD36, and macrosialin in resident mouse peritoneal macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **18**, 794-802.
- Yu, L., Quinn, M.T., Cross, A.R. and Dinauer, M.C. (1998) Gp91(phox) is the heme binding subunit of the superoxide-generating NADPH oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 7993-7998.
- Zhang, H., Schmeisser, A., Garlich, C.D., Plotze, K., Damme, U., Mugge, A., Daniel, W.G., Kurz, S., Hink, U., Nickenig, G., Borthayre, A.B., Harrison, D.G. and Munzel, T. (1999) Angiotensin II-induced superoxide anion generation in human vascular endothelial cells: role of membrane-bound NADH-/NADPH-oxidases. Evidence for a causal role of the renin-angiotensin system in nitrate tolerance. *Cardiovasc Res*, **44**, 215-222.
- Zhao, Y. and Davis, H.W. (1998) Hydrogen peroxide-induced cytoskeletal rearrangement in cultured pulmonary endothelial cells. *J Cell Physiol*, **174**, 370-379.
- Zulueta, J.J., Yu, F.S., Hertig, I.A., Thannickal, V.J. and Hassoun, P.M. (1995) Release of hydrogen peroxide in response to hypoxia-reoxygenation: role of an NAD(P)H oxidase-like enzyme in endothelial cell plasma membrane. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **12**, 41-49.

---

## **Danksagung**

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Erstellung der Dissertationsarbeit unterstützt haben.

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Holtz, dem Direktor des Institutes für Pathophysiologie der Martin-Luther-Universität Halle, für die Überlassung des interessanten Themas bedanken.

Meinen besonderen Dank gilt Herrn PD Dr. Morawietz für die freundliche Betreuung und die anregenden Diskussionen. Auch möchte ich ihm für die gebotene Möglichkeit die Ergebnisse öffentlich bei Kongressen zu präsentieren, danken.

Herrn PD Dr. Brömme und Herrn Wippich danke ich für die Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Chemilumineszenz-Methoden bzw. der ESR-Spektroskopie und für die Unterstützung bei der kritischen Bewertung der Ergebnisse.

Bei den Kooperationspartnern Herrn Prof. Dr. Galle (Universität Würzburg) bzw. Herrn Prof. Dr. Schmidt (Universität Giessen) möchte ich mich für die Bereitstellung von oxLDL bzw. für die Durchführung von Nox4-Western-Blot-Analysen bedanken.

Darüber hinaus gilt mein Dank den Leitern der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie Herrn Prof. Dr. Zerkowski bzw. Herrn Prof. Dr. Silber und den Hebammen der Klinik für Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin der Martin-Luther-Universität, des St. Barbara-Krankenhauses und des Krankenhauses Martha-Marie Halle-Dörlau für die Bereitstellung von Myokardgewebe bzw. Nabelschnüren.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Pathophysiologie danke ich für die freundliche Atmosphäre im Labor und die zahllosen interessanten Diskussionen.

Vor allem Frau Gall möchte ich herzlichen Dank für die Vorbereitungen der Inkubationsversuche und Herrn Busath für die Hilfe bei der Erstellung von Präsentationen sagen.

Auch meiner Familie danke ich für die Unterstützung meiner Arbeit und das Verständnis, wenn es abends einmal länger wurde.

---

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe von mir erstellt wurde. Es wurden nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Aus Publikationen und Werken entnommene Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt, auch nicht veröffentlicht.

Nicole Dürrschmidt

Halle (Saale), den 10.01.2003

---

## Lebenslauf

Name: Nicole Dürrschmidt

Geburtstag: 31.07.1974

Geburtsort: Plauen

09/1981 – 08/1990 Polytechnische Oberschule in Neundorf (bei Plauen)

09/1991 – 09/1993 Adolf-Diesterweg-Gymnasium in Plauen

Abschluss Abitur

10/1993 – 09/1995 Biologie-Grundstudium an der Universität Leipzig

10/1995 – 10/1998 Biologie-Hauptstudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in Halle

Diplomprüfungen in den Fächern: Mikrobiologie, Genetik, Biochemie und Immunologie

Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie zum Thema: „Weitere Charakterisierung von Klärschlammissolaten unter dem besonderen Aspekt der Verwertung von Zuckern (Aminozucker)“

11/1998 – 03/1999 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pathophysiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

04/1999 – 06/2001 Stipendium nach dem Graduiertenförderungsgesetz

seit 06/2001 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pathophysiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Nicole Dürrschmidt

Halle, den 10.01.2003

---

## Publikationen, Übersichtsarbeiten und Kongressbeiträge

### Publikationen

- 1) Morawietz, H., Rueckschloss, U., Niemann, B., **Duerrschmidt, N.**, Galle, J., Hakim, K., Zerkowski, H.-R., Sawamura, T., Holtz, J. (1999). Angiotensin II induces LOX-1, the human endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Circulation* **100**:899-902
- 2) **Duerrschmidt, N.**, Wippich, N., Goetsch, W., Broemme, H.-J., Morawietz, H. (2000). Endothelin-1 induces NAD(P)H oxidase in human endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **269**:713-717
- 3) Morawietz, H., **Duerrschmidt, N.**, Niemann, B., Galle, J., Sawamura, T., Holtz, J. (2001). Induction of the oxLDL receptor LOX-1 by endothelin-1 in human endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284**:961-965
- 4) Morawietz, H., **Duerrschmidt, N.**, Niemann, B., Galle, J., Sawamura, T., Holtz J (2002). Augmented endothelial uptake of oxidized low-density lipoprotein in response to endothelin-1. *Clin. Sci.* **103**:9S-12S

### Übersichtsarbeiten

- 1) Rueckschloss, U., **Duerrschmidt, N.**, Morawietz, H. (2003). NADPH Oxidase in Endothelial Cells: Impact on Atherosclerosis. *Antioxid. Redox Signal.*, in press

### Kongressbeiträge

- 1) Morawietz, H., Rückschloß, U., Niemann, B., **Hänel, N.**, Galle, J., Hakim, K., Zerkowski, H.-R., Holtz, J. (1999). Pro-atherosclerotic induction of the endothelial oxLDL receptor LOX-1 by angiotensin II. *Eur J Physiol* **437**:R172

- 
- 2) Morawietz, H., Rueckschloss, U., Niemann, B., **Duerrschmidt, N.**, Galle, J., Hakim, K., Zerkowski, H.-R., Sawamura, T., Holtz, J. (1999). Angiotensin II induces LOX-1, the human endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Basic Res Cardiol* **94**:413
  - 3) **Duerrschmidt, N.**, Goettsch, W., Morawietz, H. (2000). Endothelin induces NAD(P)H oxidase subunit gp91<sup>phox</sup> in human endothelial cells. *Eur J Physiol* **439**:R303
  - 4) Morawietz, H., **Dürrschmidt, N.**, Niemann, B., Galle, J., Sawamura, T., Holtz, J. (2000). Endothelin induziert den oxLDL-Rezeptor LOX-1 in humanen Endothelzellen. *Z Kardiol* **89**:122
  - 5) Göttisch, W., **Dürrschmidt, N.**, Morawietz, H. (2000). Angiotensin-vermittelte Regulation von Endothelin-converting enzyme-1-Isoformen in humanen Endothelzellen. *Z Kardiol* **89**:143
  - 6) Goettsch, W., **Dürrschmidt, N.**, Morawietz, H. (2000). Angiotensin-mediated regulation of endothelin-converting enzyme-1 isoforms in human endothelial cells. *Circulation* **102**:No 18, II-171
  - 7) Morawietz, H., **Duerrschmidt, N.**, Niemann, B., Galle, J., Sawamura, T., Holtz, J. (2001). Endothelin induces the oxLDL receptor LOX-1 in human endothelial cells. *Eur J Physiol* **441**:R129
  - 8) Morawietz, H., **Duerrschmidt, N.**, Niemann, B., Galle, J., Sawamura, T., Holtz, J. (2001). Endothelin induces the oxLDL receptor LOX-1 in human endothelial cells. *Eur Heart J* **22**:275
  - 9) Morawietz, H., **Duerrschmidt, N.**, Niemann, B., Galle, J., Sawamura, T., Holtz, J. (2001). Augmented endothelial uptake of oxidized low-density lipoprotein in response to endothelin-1. *Seventh International Conference on Endothelin, Edinburgh, UK, Book of Abstracts*:O18

- 
- 10) **Duerrschmidt, N.**, Goetsch, W., Morawietz, H. (2001). Regulation of NAD(P)H Oxidase by Arterial Shear Stress in Human Endothelial Cells. *Circulation* **104**:No 17, II-295
- 11) **Duerrschmidt, N.**, Goetsch, W., Morawietz, H. (2002). Regulation of NAD(P)H oxidase subunit expression by arterial shear stress in human endothelial cells. *Eur J Physiol* **443**:S198
- 12) **Duerrschmidt, N.**, Morawietz, H. (2002). NO-dependent downregulation of NAD(P)H oxidase by arterial laminar shear stress in human endothelial cells. *Circulation* **106** (Suppl.):II-272-II-273