

Mechanosensitive Genexpression und oxidativer Streß in Gefäßzellen: Bedeutung für die Atherosklerose

Habilitationsschrift
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium habilitatus (Dr. rer. nat. habil.)

vorgelegt der

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

von

Herrn Dr. rer. nat. Henning Morawietz
geboren am 03. November 1961 in Thale/Harz

Gutachter:

1. Frau Prof. Dr. K. Breunig, FB Biologie, MNT Fakultät, MLU Halle
2. Herr Prof. Dr. J. Holtz, Medizinische Fakultät, MLU Halle
3. Herr Prof. Dr. M. Paul, Freie Universität Berlin

Eingereicht am 15.02.2001

Termin der Verteidigung: 07.11.2001

urn:nbn:de:gbv:3-000002761

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000002761>]

Referat und bibliographische Beschreibung

Herz-Kreislaufkrankungen sind die häufigste Todesursache in den Industrieländern. Die Atherosklerose nimmt dabei eine Schlüsselstellung ein, da mit der Progression dieser Krankheit das Risiko für Bluthochdruck, koronare Herzkrankheit und Herzinfarkt steigt. Die molekularen Mechanismen der Entstehung und Lokalisierung von atherosklerotischen Plaques sind jedoch noch unvollständig verstanden.

Ziel der Arbeit war daher, potenzielle Mechanismen der Ausbildung und Lokalisierung von atherosklerotischen Plaques durch biomechanische Kräfte (Schubspannung, Dehnung), lokal erhöhte Angiotensin II (Ang II)- bzw. Endothelin-1 (ET-1)-Konzentrationen, erhöhte Apoptoseraten, oxidativen Streß oder verstärkte Aufnahme von oxidativ modifiziertem Low-Density-Lipoprotein (oxLDL) in Gefäßzellen auf molekularer Ebene zu untersuchen.

Zur Applikation von Schubspannung auf kultivierte humane Endothelzellen wurde das Modell des Plattenkegel-Viskometers etabliert. Es wurde ein Gen kloniert und molekular charakterisiert, das durch arterielle bzw. venöse laminare Schubspannung differenziell reguliert wird. Dieses Gen kodiert das humane Homolog des β -tubulin folding cofactor D und wird durch arterielle Schubspannung NO-abhängig herabreguliert.

Die Bildung des proatherosklerotischen Vasokonstriktors ET-1 wird durch laminare Schubspannung in Endothelzellen herabreguliert. Dies erfolgt auf der Ebene der Pre-Pro-Endothelin-1- und Endothelin-converting enzyme-1-mRNA, während parallel der Endothelin-Rezeptor B durch Schubspannung induziert wird.

Arterielle laminare Schubspannung verringert zusätzlich die Apoptoserate von Endothelzellen durch Herabregulation proapoptotischer Gene (Fas) und Induktion antiapoptotischer Gene (FasExo6Del, Bcl-x_L).

Diese biomechanische Regulation der Genexpression in Gefäßzellen kann durch Aktivierung bzw. Inaktivierung von Transkriptionsfaktoren (Egr-1, AP-1) vermittelt werden.

Oxidativer Streß durch Superoxidanionbildung wird als proatherosklerotischer Risikofaktor angesehen. Nicht nur die Makrophagen als Zellen der Immunabwehr besitzen die enzymatische Ausstattung zur Bildung von Superoxidanionen, sondern auch die Endothelzellen in Form einer NAD(P)H-Oxidase selbst. Die NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit gp91phox limitiert die endotheliale Superoxidanionbildung. ET-1 und Ang II induzieren dosisabhängig die mRNA-Expression von NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten und die funktionelle Superoxidanionbildung in Endothelzellen. Darüber hinaus stimulieren ET-1 und Ang II die Aufnahme des proatherosklerotischen oxLDL in Endothelzellen durch Induktion des endothelialen oxLDL-Rezeptors LOX-1. Da oxLDL zusätzlich die NAD(P)H-Oxidase und die Superoxidanionbildung stimuliert, kann ein proatherosklerotischer *Circulus vitiosus* aus ET-1- und Ang II-induzierter erhöhter Superoxidanionbildung, vermehrter oxLDL-Aufnahme und anschließender Potenzierung durch Generierung von oxidativem Streß postuliert werden. Die verringerte LOX-1- bzw. gp91phox-mRNA-Expression in *Arteria mammaria interna*-Biopsien von Patienten mit koronarer Herzkrankheit nach präoperativer medikamentöser Behandlung mit ACE-Hemmern, AT₁-Rezeptorantagonisten bzw. HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren spricht daher für ein antiatherosklerotisches Potenzial dieser primär antihypertensiven und antihypercholesterämischen Therapien.

Darüber hinaus wirkt ACE-Hemmer-Therapie kardioprotektiv durch Erhöhung der Expression der endothelialen NO-Synthase und die partielle Normalisierung der erhöhten Endothelin-converting enzyme-1-Expression im Myokard von Patienten mit Herzinsuffizienz.

Morawietz, Henning: Mechanosensitive Genexpression und oxidativer Streß in Gefäßzellen: Bedeutung für die Atherosklerose.

Halle, Univ., Math.-Nat.-Tech. Fak., Habil. 148 Seiten, 2001

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	7
1.1. Biomechanische Kräfte als Determinanten für die Lokalisation von atherosklerotischen Plaques	7
1.2. Bedeutung von Endothelin bei kardiovaskulären Erkrankungen	9
1.3. Antiapoptotische Wirkung von Schubspannung	12
1.4. Regulation von Transkriptionsfaktoren durch biomechanische Kräfte	13
1.5. Angiotensin II als proatherosklerotischer Risikofaktor	14
1.6. Oxidativer Streß, NAD(P)H-Oxidase und Atherogenese	15
1.7. Proatherosklerotische oxLDL-Aufnahme in Endothelzellen	18
2. Ziele	20
3. Material und Methoden	21
3.1. Endothelzellkultur	21
3.2. Kultivierung glatter Gefäßmuskelzellen	21
3.3. Präparation von Granulocyten	22
3.4. Gewebsbiopsien	22
3.5. Patientenkollektive	23
3.6. Applikation von Schubspannung auf Endothelzellen	26
3.7. Dehnung glatter Muskelzellen	27
3.8. RNA-Präparation	28
3.9. Reverse Transkription	28
3.10. Polymerasekettenreaktion	29
3.11. Agarose-Gelelektrophorese	31
3.12. Elution von Nukleinsäuren	31
3.13. Klonierung von DNA-Fragmenten	31
3.14. Plasmid-DNA-Präparation	32
3.15. DNA-Sequenzierung	32
3.16. Restriktionsanalyse von DNA	32
3.17. Konstruktion von internen Standards für die kompetitive PCR	32
3.18. <i>in vitro</i> -Transkription	33
3.19. Kompetitive reverse Transkriptions-Polymerasekettenreaktion	33
3.20. SmarT-PCR	34
3.21. RAP-PCR	35
3.22. Northern-Analyse	35
3.23. Proteinpräparation	36
3.24. Western-Analyse	36
3.25. ELISA-Technik	36
3.26. Inhibitorstudien	36
3.27. Transfektion von Promotordeletions-Reportergen-Konstrukten und run-on-Assay	37
3.28. EMSA-Technik	37
3.29. Quantifizierung der oxLDL-Aufnahme	38
3.30. Nachweis von Superoxidanionen durch Chemilumineszenz	38
3.31. Cytochrom c-Assay	39
3.32. Immunfluoreszenz	39
3.33. Statistik	39

4.	Ergebnisse	40
4.1.	Biomechanische Genexpression in Gefäßzellen	40
4.1.1.	Klonierung eines durch arterielle bzw. venöse Schubspannung differenziell regulierten Gens	40
4.1.2.	Molekulare Charakterisierung und schubspannungsabhängige Expression des humanen β -tubulin folding cofactor D-Gens	42
4.1.3.	Effekt von Schubspannung auf die Expression weiterer β -tubulin folding cofactor-Gene	46
4.1.4.	Regulation des Endothelin-Systems durch Schubspannung in Endothelzellen	48
4.1.5.	Schubspannungsabhängige Expression von pro- bzw. antiapoptotischen Genen	53
4.1.6.	Regulation der Transkriptionsfaktoren Egr-1 und AP-1 durch Schubspannung in Endothelzellen	58
4.1.7.	Induktion von Egr-1 und c-jun durch Dehnung in glatten Gefäßmuskelzellen	61
4.2.	Induktion von Superoxidanionbildung und oxLDL-Aufnahme in Endothelzellen	66
4.2.1.	Nachweis und molekulare Charakterisierung von NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten in humanen Endothelzellen	66
4.2.2.	Induktion der NAD(P)H-Oxidase durch Angiotensin-II, Endothelin-1 und oxLDL	69
4.2.3.	Induktion des endothelialen oxLDL-Rezeptors LOX-1 durch Angiotensin-II und ET-1	75
4.3.	Klinische und tierexperimentelle Untersuchungen	78
4.3.1.	Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit gp91phox und von LOX-1 in arteriellen Biopsien von Patienten mit koronarer Herzkrankheit	78
4.3.2.	Wechselwirkungen des Renin-Angiotensin- und des Endothelin-Systems <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	81
4.3.2.1.	Tierexperimentelle Untersuchungen	81
4.3.2.2.	Expression des ET-Systems in arteriellen Biopsien von Patienten mit koronarer Herzkrankheit	82
4.3.2.3.	Expression des ET-Systems in Myokardgewebe von Patienten mit koronarer Herzkrankheit bzw. Herzinsuffizienz	83
4.3.3.	Induktion der endothelialen NO-Synthase durch ACE-Hemmer-Therapie im Myokard von Patienten mit Herzinsuffizienz	85
4.3.4.	Expression des Endothelin-Systems im Myokard von herzinsuffizienten Patienten mit bzw. ohne mechanischer Entlastung durch ventrikuläre Assist-Systeme	88
5.	Diskussion	90
5.1.	Biomechanische Genexpression in Gefäßzellen	90
5.1.1.	Molekulare Charakterisierung und schubspannungsabhängige Expression des humanen β -tubulin folding cofactor D	91
5.1.2.	Regulation des Endothelin-Systems durch Schubspannung	94
5.1.3.	Schubspannungsabhängige Expression von pro- bzw. antiapoptotischen Genen	96
5.1.4.	Regulation der Transkriptionsfaktoren Egr-1 und AP-1 durch biomechanische Kräfte	98
5.2.	Induktion von Superoxidanionbildung und oxLDL-Aufnahme in Endothelzellen	103
5.2.1.	Nachweis und molekulare Charakterisierung von NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten in humanen Endothelzellen	103

5.2.2.	Induktion der NAD(P)H-Oxidase durch Angiotensin-II, Endothelin-1 und oxLDL	104
5.2.3.	Induktion der oxLDL-Aufnahme durch Angiotensin-II und Endothelin-1	108
5.3.	Klinische und tierexperimentelle Untersuchungen	109
5.3.1.	Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit gp91phox und von LOX-1 in arteriellen Biopsien von Patienten mit koronarer Herzkrankheit	109
5.3.2.	Wechselwirkungen des Renin-Angiotensin- und des Endothelin-Systems <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	110
5.3.3.	Induktion der eNOS durch ACE-Hemmer-Therapie im Myokard von Patienten mit Herzinsuffizienz	113
5.3.4.	Regulation des ET-Systems bei mechanischer Entlastung durch ventrikuläre Assist-Systeme	114
6.	Zusammenfassung	115
6.1.	Biomechanische Regulation der Genexpression in Gefäßzellen	115
6.2.	Induktion von Superoxidanionbildung und oxLDL-Aufnahme in Endothelzellen	116
6.3.	Klinische und tierexperimentelle Untersuchungen	117
7.	Literatur	119
8.	Anhang	143
8.1.	Lebenslauf	143
8.2.	Erklärung	144
8.3.	Danksagung	145
8.4.	Thesen	146

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	MW	Mittelwert
ACE	Angiotensin-converting enzyme	NADH	Nikotinsäureamidadenin- dinukleotid (reduzierte Form)
Ang II	Angiotensin II		
AP-1	Activator protein-1	NADPH	Nikotinsäureamidadenin- dinukleotidphosphat (reduzierte Form)
AT ₁	Angiotensin II-Rezeptor Typ 1		
AT ₂	Angiotensin II-Rezeptor Typ 2		
Bcl-2	B-cell lymphoma/leukemia-2	nNOS	neuronale NO-Synthase
Bcl-x _L	B-cell lymphoma/leukemia-x _L	NO	Stickstoffmonoxid
bp	Basenpaare	NYHA	New York Heart Association
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure	O ₂ ⁻	Superoxidanion
cRNA	copy Ribonukleinsäure	OD	optische Dichte
CsCl	Cäsiumchlorid	ONOO ⁻	Peroxynitrit
CSE	Cholesterinsyntheseenzym	oxLDL	oxidativ modifiziertes Low- Density-Lipoprotein
DEPC	Diethylpyrocarbonat	PBS	Phosphat-gepufferte Saline
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PCR	Polymerasekettenreaktion
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	phox	phagocyte oxidase
DPI	Diphenyleniodoniumchlorid	PKC	Proteinkinase C
DTT	Dithiothreitol	PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
ECE-1	Endothelin-converting enzyme-1	PPET-1	Pre-Pro-Endothelin-1
ECL	enhanced chemiluminescence	RAP-PCR	RNA arbitrarily primed- polymerase chain reaction
EDTA	Ethylendinitrilo-Tetraacetat		
Egr-1	Early growth response gene-1	RAS	Renin-Angiotensin-System
EMSA	electrophoretic mobility shift assay	rel.	relativ
eNOS	endotheliale NO-Synthase	RGD	Arg-Gly-Asp-Motiv
ET-1	Endothelin-1	RNA	Ribonukleinsäure
ET _A	Endothelin-Rezeptor A	rNTP	Ribonukleosidtriphosphat
ET _B	Endothelin-Rezeptor B	ROS	reaktive Sauerstoffspezies
Fas	FS7-associated cell surface antigen	rpm	Umdrehungen pro Minute
GTC	Guanidinisothiocyanat	RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid	RU	Relative units
HBSS	Hank's balanced salt solution	SDS	Natriumdodecylsulfat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'- 2-Ethan-Sulfonsäure	SEM	Standardfehler
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells	SOD	Superoxid-Dismutase
iNOS	induzierbare NO-Synthase	SSD-1	shear stress downregulated gene-1
kb	Kilobasenpaare	Tab.	Tabelle
KHK	koronare Herzkrankheit	tfcA	β-tubulin folding cofactor A
KS	Kälberserum	tfcD	β-tubulin folding cofactor D
LDL	Low-Density-Lipoprotein	Tris	Tris-Hydroxymethyl- Aminomethan
L-NNA	Nω-Nitro-L-Arginin	U	Unit (Einheit)
L-NAME	Nω-Nitro-L-Arginin-Methyl- Ester	VAD	Ventrikuläres Assist-System
LOX-1	lectinlike oxLDL receptor-1	vs.	versus (im Vergleich zu)
max.	maximal	VSMC	vascular smooth muscle cells
mRNA	messenger RNA	X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D- galactopyranosid

1. Einleitung

Herz-Kreislaufkrankungen sind die häufigste Todesursache in den Industrieländern. Die Atherosklerose nimmt dabei eine Schlüsselstellung ein, da mit der Progression dieser Krankheit das Risiko für Bluthochdruck, koronare Herzkrankheit (KHK) und Herzinfarkt steigt (Lusis, 2000). Bekannte Risikofaktoren der Atherosklerose und der KHK sind Hypertonie, Hypercholesterinämie, Rauchen, erhöhte Herzfrequenz, Diabetes mellitus, Hyperurikämie, Adipositas, Bewegungsmangel, Streß, hohes Alter sowie Geschlecht (erhöhtes Risiko bei Männern) (Guidelines Subcommittee, 1999). Durch atherosklerotische Veränderungen der Gefäßwand kommt es zur Potenzierung endothelialer Dysfunktion, zunehmender Lumeneinengung, Abnahme der arteriellen Elastizität, und im Fall der Ruptur atherosklerotischer Plaques zu lebensbedrohlichen Komplikationen wie Herzinfarkt oder Apoplex.

Die Pathogenese der Atherosklerose ist durch die Akkumulation von intra- und extrazellulären Lipiden, Monozyten/Makrophagen-Infiltration, Schaumzellbildung, Proliferation glatter Muskelzellen, die Akkumulation von Bindegewebsproteinen sowie im Spätstadium durch Calciumeinlagerung in die Gefäßwand gekennzeichnet (Ross, 1993; Ross, 1999). Die molekularen Mechanismen der Entstehung und Lokalisierung von atherosklerotischen Plaques in der Gefäßwand sind jedoch nur unvollständig aufgeklärt.

1.1. Biomechanische Kräfte als Determinanten für die Lokalisation von atherosklerotischen Plaques

Bereits Mitte des vorigen Jahrhunderts wurde beschrieben, daß es im Gefäßsystem offensichtlich Prädispositionsstellen für die Entstehung atherosklerotischer Plaques, z.B. an Verzweigungen arterieller Gefäße, gibt (von Rokitsansky, 1852; Virchow, 1860). Aus diesem spezifischen Verteilungsmuster wurde die Hypothese abgeleitet, daß die lokalen biomechanischen Kräfte die Entstehung und Progression der Atherosklerose beeinflussen (Davies et al., 1995).

Wichtige in der Gefäßwand wirkende biomechanische Kräfte sind Schubspannung ("shear stress") und Dehnung. Während die Schubspannung primär auf die Endothelzellen der Gefäßwand in Richtung des strömenden Blutes wirkt, hat die Dehnung Einfluß auf Endothel- und glatte Muskelzellen. Die Atherosklerose-Prädispositionsstellen befinden sich in elastischen Arterien an Gefäßabschnitten mit lokal erhöhter Dehnung und verringerter Schubspannung (Abb. 1).

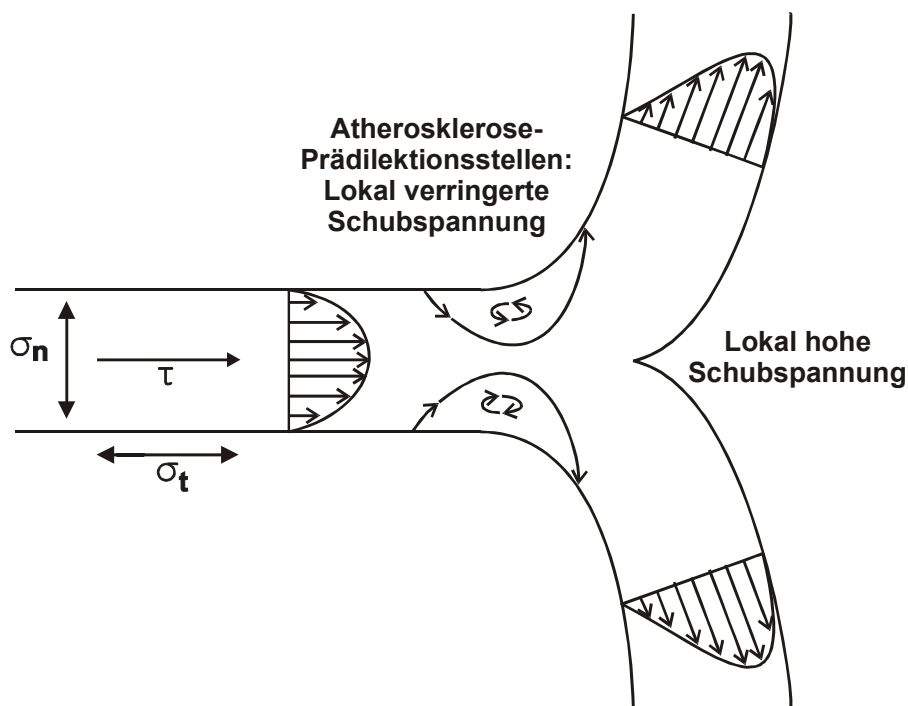


Abb. 1: Biomechanische Kräfte als Determinanten für die Lokalisierung von atherosklerotischen Plaques im Gefäßsystem. An Gefäßverzweigungen kommt es bei hoher arterieller Dehnung lokal zu verringerter Schubspannung (τ , z.T. mit Strömungsumkehr), die mit Atherosklerose-Prädilektionsstellen korreliert.

Gleichmäßige, laminare Schubspannung wird als atheroprotektive Kraft angesehen (Traub and Berk, 1998). Antiatherosklerotische Wirkungen laminarer Schubspannung sind u.a. die verstärkte endotheliale Bildung von Prostazyklin (PGI_2) und von Stickstoffmonoxid (NO) (Frangos et al., 1985; Pohl et al., 1986; Nishida et al., 1992). Beide Substanzen wirken vasodilatierend und hemmen die Thrombozytenaggregation (Radomski et al., 1987; Busse and Fleming, 1998). NO hemmt die Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen (Khan et al., 1996), wodurch eine Infiltration von Makrophagen in die Intima der Gefäßwand verhindert wird. Das NO wirkt antimigratorisch, antiproliferativ und antiapoptotisch (Garg and Hassid, 1989; Dimmeler et al., 1997b). Auch die schubspannungsabhängige Freisetzung von “transforming growth factor β ” ($\text{TGF}\beta$) hat antiproliferative Wirkungen auf die glatten Muskelzellen (Ohno et al., 1995). Zusätzlich werden verstärkt die antithrombotischen Mediatoren Gewebeplasminogenaktivator (tPA) und Thrombomodulin freigesetzt (Diamond et al., 1989; Takada et al., 1994) (Abb. 2). Die molekularen Mechanismen der atheroprotektiven Wirkung von laminarer Schubspannung sind bisher jedoch nur unvollständig verstanden (Davies et al., 1997; Traub and Berk, 1998; Gimbrone et al., 2000).

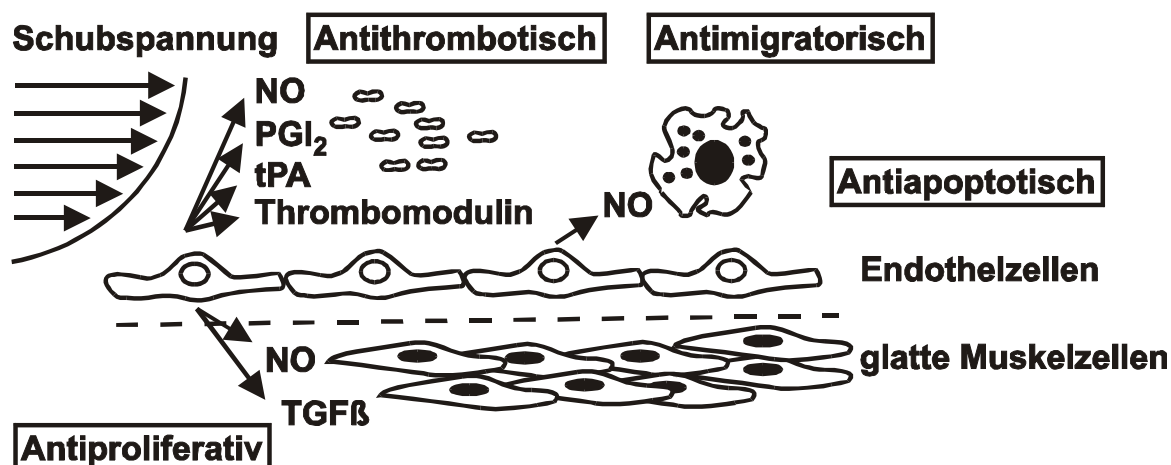


Abb. 2: Antiatherosklerotische Wirkungen laminarer Schubspannung. Laminare Schubspannung wirkt antithrombotisch, antimigratorisch, antiapoptotisch und antiproliferativ. Diese Effekte werden u.a. durch schubspannungsabhängige endotheliale Freisetzung von NO, Prostazyklin (PGI₂), Gewebeplasminogenaktivator (tPA), Thrombomodulin und “transforming growth factor β” (TGFβ) vermittelt (modifiziert nach Traub and Berk, 1998).

Als *in vitro*-Modellsysteme für die Applikation von laminarer Schubspannung auf kultivierte Endothelzellen sind Plattenkegel-Viskometer und Strömungskammern beschrieben worden (Dewey et al., 1981; Sdougos et al., 1984; Levesque and Nerem, 1985; Frangos et al., 1988). Chronische Applikation von hoher laminarer Schubspannung bewirkt eine Differenzierung und Ausrichtung der Endothelzellen in Strömungsrichtung *in vivo* und *in vitro* (Flaherty et al., 1972; Dewey et al., 1981). Dies ist mit komplexen Umbauten im endothelialen Zytoskelett und der Ausbildung von Aktin-Streß-Fasern verbunden (Wong et al., 1983; Franke et al., 1984). Eine systematische Untersuchung der Regulation der Genexpression nach Applikation chronischer arterieller oder venöser laminarer Schubspannung auf Endothelzellen ist bisher nicht durchgeführt worden.

1.2. Bedeutung von Endothelin bei kardiovaskulären Erkrankungen

Ein interessantes Molekül, das an der Entstehung und Progression der Atherosklerose beteiligt sein könnte, ist das Endothelin-1 (ET-1). ET-1 gilt als der stärkste bisher identifizierte Vasokonstriktor (Yanagisawa et al., 1988). Neben dem ET-1 gibt es 2 weitere Mitglieder der Endothelin-Familie (ET-2 und -3), die von separaten Genen kodiert werden (Inoue et al., 1989). ET-1 ist in Endothelzellen vorherrschend und das bisher am besten untersuchte Endothelin. Inzwischen wurde eine ET-1-Bildung auch in zahlreichen anderen Zelltypen (u.a. glatte Muskelzellen, Fibroblasten, Kardiomyozyten) nachgewiesen. Das ET-1 wirkt neben seiner vasokonstriktorisches Komponente proliferativ in glatten Muskelzellen,

positiv inotrop in Kardiomyozyten und scheint ein wichtiges Signalmolekül in der frühen Embryonalentwicklung zu sein (Masaki, 2000).

Das ET-1 ist ein Peptid von 21 Aminosäuren. Während der ET-1-Synthese wird das Vorläuferprotein (Pre-Pro-ET-1, PPET-1) zunächst durch eine Prohormon-Konvertase (wahrscheinlich Furin) proteolytisch in das weitgehend inaktive Big ET-1 von 38 Aminosäuren gespalten. Das biologisch aktive ET-1 wird anschließend durch das Endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1) gebildet (Xu et al., 1994; Schmidt et al., 1994) (Abb. 3).

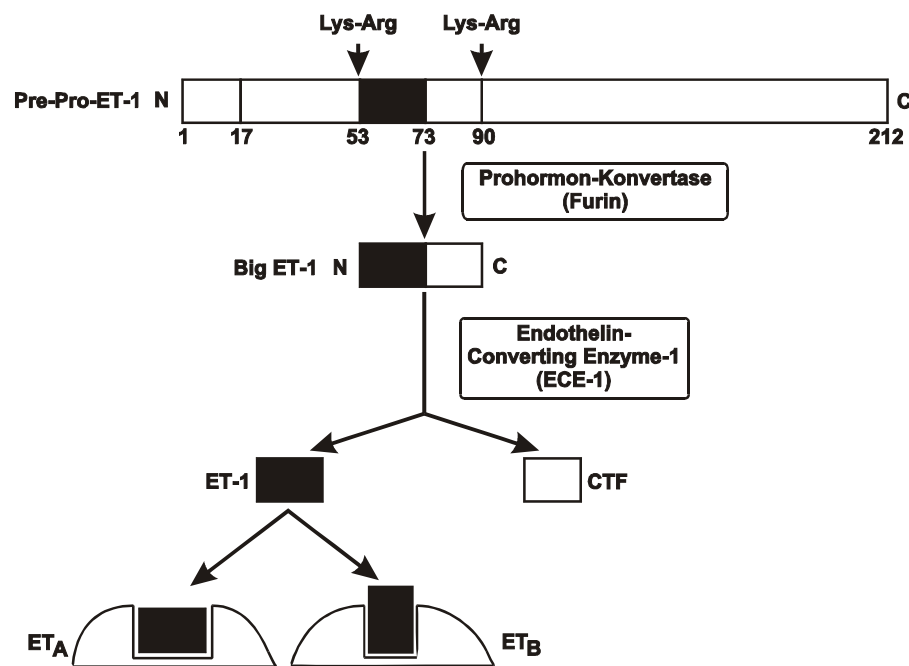


Abb. 3: Das Endothelin-System. Das Endothelin-1 (ET-1) wird durch proteolytische Spaltung aus einem Vorläuferprotein (Pre-Pro-ET-1) durch aufeinanderfolgende proteolytische Spaltung mit einer Prohormon-Konvertase (wahrscheinlich Furin) und dem Endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1) gebildet (CTF, C-terminales Fragment). Das Endothelin vermittelt seine Wirkungen durch Bindung an die G-Protein-gekoppelten Endothelin-Rezeptoren A und B (ET_A, ET_B).

ECE-1 ist eine Typ II-membranintegrierte Metalloendopeptidase mit Homologie zur neutralen Endopeptidase-24.11 (E-24.11) (Turner and Murphy, 1996). Für ECE-1 sind mindestens drei Isoformen (ECE-1a, -1b, -1c) bekannt (Shimada et al., 1995; Schmidt et al., 1994; Schweizer et al., 1997). Die ECE-Isoformen werden von einem Gen kodiert und besitzen unterschiedliche zytoplasmatische, N-terminale Proteinsequenzen (Valdenaire et al., 1995). Die katalytische Domäne der ECE-1-Isoformen ist identisch. ECE-1a ist in der Plasmamembran, ECE-1b hauptsächlich intrazellulär im Golgi-Apparat und ECE-1c vorrangig in der Plasmamembran und z.T. intrazellulär lokalisiert (Schweizer et al., 1997).

Die unterschiedlichen ECE-1-Isoformen können differenziell reguliert werden (Orzechowski et al., 1997).

Die Endothelinwirkung vermitteln mindestens zwei Rezeptoren: Endothelin-Rezeptor A (ET_A) und B (ET_B) (Hosoda et al., 1991; Ogawa et al., 1991). Die Affinität der ET-Isoformen zu den Rezeptoren ist unterschiedlich. Während ET-1 und ET-2 eine höhere Affinität zu ET_A besitzen als ET-3, ist die Affinität für alle drei Isoformen gegenüber dem ET_B-Rezeptor ähnlich. Beide ET-Rezeptoren wurden in glatten Muskelzellen, Fibroblasten und Kardiomyozyten nachgewiesen. Im Herzen dominiert funktionell der ET_A-Rezeptor (Pönicke et al., 1998). Die ET-Rezeptoren gehören zur Gruppe der siebenfach-gefalteten Transmembran-Rezeptorproteine und sind G-Protein-gekoppelt (G_i/G_q) (Plumpton et al., 1996; Sugden and Bogoyevitch, 1996). Vorrangig erfolgt die ET-Signaltransduktion mittels G_{q/11} durch Phospholipase C (PLC)-Aktivierung und Diacylglycerin (DAG)- und Inositoltrisphosphat (IP₃)-Bildung und führt damit zu einer intrazellulären Ca²⁺-Erhöhung (Takigawa et al., 1995). In Kardiomyozyten der Ratte und im rechten humanen Atrium können ET-Rezeptoren auch eine Hemmung der Adenylatcyclase über ein Pertussistoxin-sensitives G-Protein vermitteln (Hilal-Dandan et al., 1994; Vogelsang et al., 1994).

Die ET-1-Plasmaspiegel sind bei Patienten mit Hypertonie und koronarer Herzkrankheit sowie einer Reihe weiterer pathophysiologischer Zustände erhöht (Miyachi and Masaki, 1999). An Atherosklerose-Prädilektionsstellen wurden lokal erhöhte Konzentrationen von ET-1 nachgewiesen (Lerman et al., 1991; Lerman et al., 1995). Pharmakologische Hemmung der Endothelin-Wirkung durch Rezeptorblockade führt in tierexperimentellen Studien zu einer deutlich verringerten Ausbildung von atherosklerotischen Plaques (Barton et al., 1998). Darüber hinaus könnte ET-1 eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Herzinsuffizienz spielen (Miyachi and Masaki, 1999). So wurden erhöhte ET-1-Gewebs- und Plasmaspiegel in experimentellen und klinischen Herzinsuffizienzstudien (Margulies et al., 1990; Sakai et al., 1996b; Pieske et al., 1999) und eine erhöhte ECE-1-Expression in atrialem Myokard von Postinfarkt-Patienten gezeigt (Bohnemeier et al., 1998). ET-Rezeptorblockade senkt darüber hinaus die Mortalität in einem Ratten-Infarkt-Modell (Sakai et al., 1996a).

Die Untersuchungen zur Regulation der Endothelin-Synthese durch Schubspannung in Endothelzellen sind bisher widersprüchlich. Initial wurde eine schubspannungsabhängige Induktion der ET-1-Bildung beschrieben (Yoshizumi et al., 1989; Morita et al., 1994). Andere Gruppen fanden keinen Effekt auf die ET-1-Synthese (Noris et al., 1995), oder eine Herabregulation der Pre-Pro-ET-1-mRNA und der ET-1-Freisetzung in Endothelzellen (Sharefkin et al., 1991; Malek and Izumo, 1992; Kuchan and Frangos, 1993). Die

schubspannungsabhängige Regulation von ECE-1 und ET_B ist bisher nicht untersucht worden. Darüber hinaus ist die Expression von Genen des Endothelin-Systems im Myokard von Patienten mit bzw. ohne Angiotensin-converting enzyme (ACE)-Hemmer-Therapie oder mechanischer Entlastung durch ventrikuläre Assist-Systeme vor einer Herztransplantation nicht untersucht worden.

1.3. Antiapoptotische Wirkung von Schubspannung

Die Mechanismen des programmierten Zelltodes (Apoptose) sind in den letzten Jahren intensiv untersucht worden. Eine lokal erhöhte Apoptoserate könnte mit dem Verlust atheroprotektiver Wirkungen eines intaktes Endothels assoziiert sein. Eine Reihe von Stimuli, darunter pathophysiologisch relevante wie Angiotensin II und oxidativ modifiziertes Low-Density-Lipoprotein (oxLDL), induzieren eine erhöhte Apoptoserate in kultivierten Endothelzellen, die durch Applikation laminarer Schubspannung verhindert werden kann (Dimmeler et al., 1996; Dimmeler et al., 1997a, c). Die molekularen Mechanismen dieser antiapoptotischen, endothelprotektiven Wirkung von laminarer Schubspannung sind bisher noch nicht detailliert untersucht worden.

Der Apoptose-auslösende Oberflächenrezeptor Fas kann durch alternatives Splicing des primären Fas-Transkripts antiapoptotische Fas-Isoformen bilden. Der antiapoptotischen Fas-Isoform FasExo6Del fehlt die Transmembrandomäne. Dadurch kann sie als lösliches Protein sekretiert werden und durch kompetitive Bindung an den Fas-Liganden Apoptose verhindern (Cascino et al., 1996).

Die antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie sind dagegen Proteine der äußeren Mitochondrienmembran und anderer intrazellulärer Membranen (Reed, 1996). Bcl-x_L und Bcl-2 verhindern nicht nur den Apoptose-assoziierten Abbau des mitochondrialen Transmembranpotentials und die Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien, sondern auch die Cytochrom c-induzierte Aktivierung von Caspase-9 (Kharbanda et al., 1997; Kluck et al., 1997). Mcl-1 vermittelt eine analoge antiapoptotische Wirkung (Wang and Studzinski, 1997). Die antiapoptotische Wirkung von Bcl-x_L und Bcl-2 kann jedoch durch Heterodimerisierung mit den proapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie Bak oder Bax gehemmt werden (Reed, 1996). Die Überexpression von Bax führt zu mitochondrialer Dysfunktion mit anschließender Cytochrom c-Freisetzung, die durch Bcl-x_L-Heterodimerisierung gehemmt werden kann (Finucane et al., 1999). Inwiefern proapoptotische (z.B. Fas, Bak, Bax) bzw. antiapoptotische Gene (z.B. Bcl-x_L, Bcl-2, Mcl-1) durch laminare Schubspannung reguliert werden, ist bisher nicht untersucht worden.

1.4. Regulation von Transkriptionsfaktoren durch biomechanische Kräfte

Neben der Schubspannung ist die Dehnung die wichtigste biomechanische Kraft in der Gefäßwand. Erhöhte mechanische Dehnung z.B. bei hämodynamischer Überlast, wird als möglicher proliferativer Stimulus für glatte Muskelzellen, z.B. in der Spätphase der Atherosklerose, angesehen (Osol, 1995). Im Labor von Harlan E. Ives am Cardiovascular Research Institute der University of California, San Francisco, sind in den letzten Jahren Methoden zur zyklischen mechanischen Dehnung kultivierter glatter Muskelzellen auf elastischen Membranen entwickelt worden. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, daß zyklische Dehnung die DNA-Synthese in glatten Muskelzellen durch autokrine Bildung von "platelet-derived growth factor" (PDGF) stimuliert (Wilson et al., 1993). Im PDGF A-Promotor wurde nach Transfektion von Promotordeletionskonstrukten in glatte Muskelzellen und anschließende Dehnung eine dehnungssensitive Region von 92 bp identifiziert, die eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor "Early growth response gene-1" (Egr-1) enthält (Wilson et al., 1998).

Das Egr-1-Gen ist in die Regulation von Mitose und Differenzierung involviert (Sukhatme et al., 1988). Eine Reihe von Stimuli, z.B. Wachstumsfaktoren, Serum oder vasokonstriktorisches Peptid, können die Egr-1-Expression induzieren (Gashler and Sukhatme, 1995). Das Egr-1-Protein kann die Promotorregion anderer Gene an einer spezifischen GC-reichen Erkennungssequenz binden und die Transkription aktivieren oder inaktivieren (Cao et al., 1990).

Ein weiterer Transkriptionsfaktor der "immediate-early"-Gene ist das "Activator protein-1" (AP-1) (Curran and Franza, 1988). AP-1 besteht in der Regel aus Heterodimeren aus c-jun und c-fos, oder aus c-jun-Homodimeren. Der Einfluß von zyklischer mechanischer Dehnung auf die Expression von Egr-1, c-jun und c-fos in vaskulären glatten Muskelzellen wurde bisher nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die dehnungssensitive Expression dieser Transkriptionsfaktoren in glatten Muskelzellen untersucht. Außerdem wurde der Einfluß von Schubspannung auf die Expression von Egr-1, c-jun und c-fos in humanen Endothelzellen analysiert. Damit sollten erste Einblicke in die Regulation der vaskulären Genexpression durch biomechanische Kräfte infolge Aktivierung bzw. Inaktivierung von Transkriptionsfaktoren gewonnen werden.

1.5. Angiotensin II als proatherosklerotischer Risikofaktor

Das Angiotensin II (Ang II) könnte in die Pathogenese der Atherosklerose involviert sein (Holtz and Goetz, 1994; Kim and Iwao, 2000). In den Gefäßen bewirkt Ang II eine ausgeprägte Vasokonstriktion. Es stimuliert in der Nebennierenrinde die Aldosteron-Sekretion, wodurch die distal-tubuläre Natriumresorption gesteigert wird. Ang II wirkt zusätzlich proliferativ in glatten Muskelzellen, positiv inotrop im Myokard und erhöht in Endothelzellen die Apoptoserate (Dimmeler et al., 1998).

Das Oktapeptid Ang II wird durch proteolytische Spaltung aus dem Vorläuferprotein Angiotensinogen mit Hilfe der Protease Renin und anschließende Spaltung des Dekapeptids Ang I durch das Angiotensin-converting enzyme (ACE) gebildet (Weir and Dzau, 1999). Die Ang II-Wirkungen werden vorrangig über die G-Protein-gekoppelten Angiotensin-Rezeptoren Typ 1 und 2 (AT₁, AT₂) vermittelt (de Gasparo et al., 2000). AT₁ dominiert in den meisten vaskulären Geweben und ist vorrangig für den Bluthochdruck, die proliferativen Effekte und die Aldosteronsekretion verantwortlich. Es ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der durch Aktivierung der PLC zur Bildung von DAG und IP₃ mit nachfolgendem intrazellulärem Anstieg der Ca²⁺-Konzentration führt. DAG und Ca²⁺ aktivieren die Proteinkinase C und die Ca²⁺-Calmodulin-abhängigen Kinasen und somit die Phosphorylierung von Proteinen. Der AT₂-Rezeptor dagegen wird häufig in fetalen Geweben exprimiert (Nahmias and Strosberg, 1995). Daher wird eine Rolle in der Entwicklung, bei Wachstumsvorgängen und neuronalen Funktionen vermutet. In der Kreislaufregulation wird AT₂ als Gegenspieler von AT₁ diskutiert (Unger, 1999). Daneben sind jedoch zusätzliche Ang II-Rezeptoren beschrieben worden (Unger et al., 1996; de Gasparo et al., 2000).

Die pharmakologische Hemmung der Ang II-Bildung durch Angiotensin-converting enzyme (ACE)-Hemmer sowie die Blockade der Ang II-Wirkung durch AT₁-Rezeptorantagonisten sind heute Standardtherapien in der Behandlung von Hypertonie bzw. Herzinsuffizienz. Insbesondere der Stellenwert der ACE-Hemmer-Therapie als "Goldstandard" in der Behandlung der Herzinsuffizienz ist in großen klinischen Studien durch Senkung von Mortalität und Morbidität eindrucksvoll unter Beweis gestellt worden (Flather et al., 2000). In der Val-Heft-Studie (Valsartan in Heart Failure Trial) (Cohn et al., 2000), deren Ergebnisse im November 2000 auf der Jahrestagung der American Heart Association vorgestellt wurden, verzögerte bei herzinsuffizienten Patienten mit Standardtherapie auf ACE-Hemmer-Basis eine zusätzliche AT₁-Rezeptorblockade die Progression des Schweregrades der Herzinsuffizienz und verringerte schwere klinische Komplikationen.

Darüber hinaus ist eine Rolle des Ang II in der Pathogenese der Atherosklerose postuliert worden (Holtz and Goetz, 1994). Diese Hypothese wird durch eine Reihe aktueller Studien unterstützt. Durch ACE-Hemmer-Therapie konnte die Mortalität bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit gesenkt werden (Yusuf et al., 2000). In tierexperimentellen Studien wurden antiatherosklerotische Effekte einer AT₁-Rezeptorblockade gezeigt (Strawn et al., 2000). Eine AT₁-Rezeptorblockade verbessert zusätzlich die endotheliale Dysfunktion in Patienten mit Atherosklerose und KHK (Prasad et al., 2000). Die molekularen Mechanismen der kardioprotektiven Wirkung von ACE-Hemmern und AT₁-Rezeptorantagonisten sind jedoch noch unvollständig verstanden und wurden daher in der vorliegenden Arbeit detaillierter untersucht.

1.6. Oxidativer Streß, NAD(P)H-Oxidase und Atherogenese

Ein proatherosklerotischer Risikofaktor, der in den letzten Jahren zunehmend in das wissenschaftliche Interesse der Herz-Kreislaufforschung gerückt ist, ist der oxidative Streß. Oxidativer Streß durch Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (z.B. Superoxidanionen) verringert die Verfügbarkeit des antiatherosklerotischen Schutzfaktors NO durch Reaktion zum zytotoxischen Peroxynitrit (Gryglewski et al., 1986). Neben lokaler Endothelzellschädigung und endothelialer Dysfunktion können diese Sauerstoffspezies auch zur vermehrten Bildung des proatherosklerotischen oxidativ modifizierten Low-Density-Lipoproteins (oxLDL) führen (Griendling et al., 2000).

ROS können durch Autooxidation von Katecholaminen, Flavinen oder Ferredoxinen entstehen (Del Maestro, 1980). Es existieren jedoch auch eine Reihe von Enzymsystemen, die konstitutiv oder induzierbar ROS generieren können. Dies sind u.a. Enzyme der mitochondrialen Atmungskette, Xanthin-Oxidasen, NO-Synthasen, Zyklooxygenasen, Lipoxygenasen, Cytochrom P450-Monooxygenasen und NAD(P)H-Oxidasen (Kehrer, 1993; Freeman et al., 1995). Eine zentrale Stellung innerhalb der ROS nimmt das Superoxidanion (O_2^-) ein. Aus ihm entsteht in einer durch Superoxid-Dismutase (SOD) katalysierten Reaktion H_2O_2 , das durch Katalase in das Hydroxylradikal ($HO\bullet$) überführt wird. $HO\bullet$ reagiert mit fast allen organischen zellulären Komponenten in Zellen (Czapski, 1984). O_2^- ist dagegen in seinem Reaktionsverhalten selektiver als $HO\bullet$. Die Reaktion von O_2^- mit NO zu Peroxynitrit ($ONOO^-$) ist eine der schnellsten bisher bekannten chemischen Reaktionen (Freeman et al., 1995).

In Endothelzellen wurde funktionell als Hauptquelle von Superoxidanionen eine NAD(P)H-Oxidase beschrieben (Mohazzab et al., 1994). Die NAD(P)H-Oxidase spielt auch

in kultivierten glatten Muskelzellen und intakten Aortensegmenten eine wichtige Rolle (Griendling et al., 1994; Pagano et al., 1995). Das Enzym ist bereits in Monozyten/Makrophagen sehr gut charakterisiert worden. In diesen Zellen führt ein induzierbarer “oxidative burst” zu einer antipathogenen Wirkung. Mutationen in Untereinheiten der NAD(P)H-Oxidase führen zum Krankheitsbild der chronischen Granulomatose (Segal et al., 1978; Nuno et al., 1988; Patino et al., 1999). Sie ist gekennzeichnet durch eine wesentlich höhere Anfälligkeit gegenüber Infektionen infolge der stark eingeschränkten Pathogenabwehr (Smith and Curnutte, 1991). Der NAD(P)H-Oxidase-Komplex ist sowohl in Plasmamembranen als auch in Membranen sekretorischer Vesikel lokalisiert. Nach Aktivierung durch geeignete Stimuli fusionieren die Membranen dieser Vesikel mit der Plasmamembran. Bei der Phagozytose von Pathogenen wird der NAD(P)H-Oxidase-Komplex dann Bestandteil der Phagolysosomenmembran (Segal and Jones, 1980). Der schematische Aufbau der NAD(P)H-Oxidase ist in Abb. 4 dargestellt.

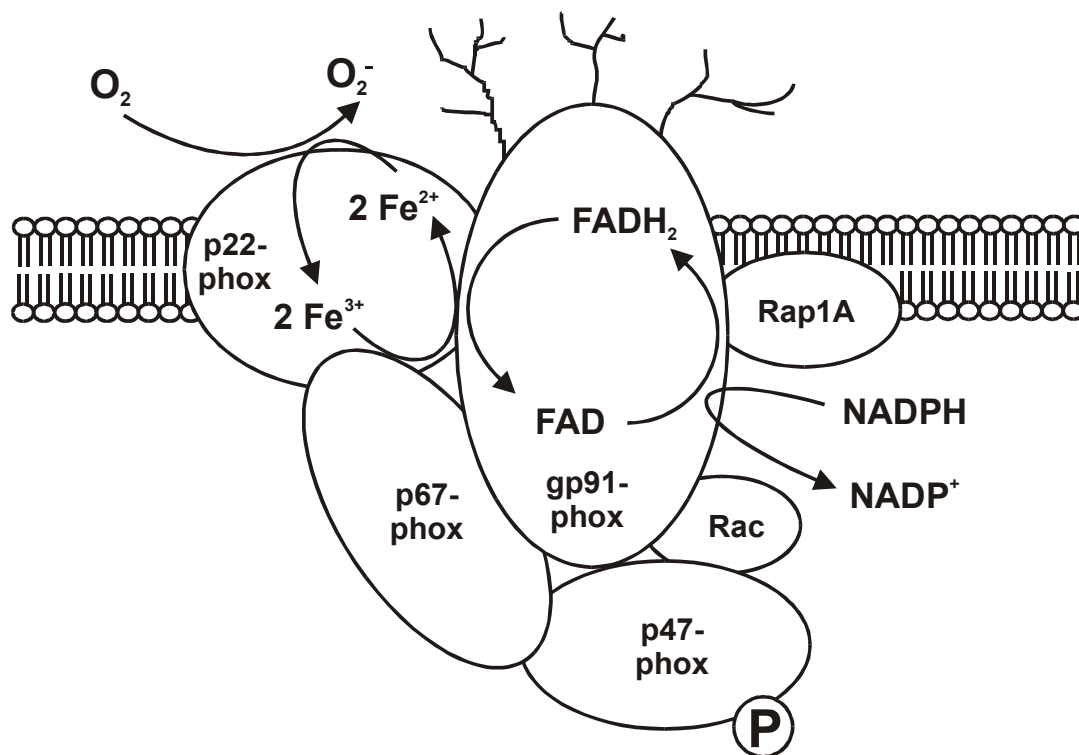


Abb. 4: Schematischer Aufbau des NAD(P)H-Oxidase-Komplexes. Die Untereinheiten p22phox und gp91phox bilden das membranständige Cytochrom b_{558} , an das die prosthetischen Gruppen FAD und Häm gebunden sind. Diese sind an der Elektronenübertragung von NADPH auf Sauerstoff beteiligt. Zusätzlich gehören zum aktiven Enzymkomplex die Untereinheiten p67phox und p47phox, sowie die kleinen G-Proteine Rac und Rap1A.

Die NAD(P)H-Oxidase ist ein multimerer Komplex aus mehreren Untereinheiten. Grundbaustein ist das membranständige Cytochrom b_{558} (Segal and Jones, 1978) aus den Untereinheiten p22phox (phox: phagocyte oxidase) und dem Glykoprotein gp91phox (Royer-Pokora et al., 1986; Dinanuer et al., 1987; Teahan et al., 1987). An diese Untereinheiten sind die prosthetischen Gruppen FAD und Häm gebunden, die an der Elektronenübertragung von NADPH auf molekularen Sauerstoff beteiligt sind (Quinn et al., 1992; Rotrosen et al., 1992; Segal et al., 1992). Die beiden Untereinheiten p47phox und p67phox sind im nicht aktivierten Zustand im Zytosol lokalisiert (Nunoi et al., 1988; Volpp et al., 1988). Bei Aktivierung wird p47phox PKC-abhängig phosphoryliert. Nach Komplexbildung mit p67phox translozieren beide Untereinheiten an das membranständige Cytochrom b_{558} und die O_2^- -Bildung wird induziert (Clark et al., 1990). Das im Phagolysosom gebildete O_2^- und die Produkte H_2O_2 und $HO\bullet$ oxidieren anschließend Zellwandbestandteile der phagozytierten Pathogene. Zusätzlich sind für die Funktion der NAD(P)H-Oxidase kleine G-Proteine (Rac/Rap1A) notwendig (Eklund et al., 1991; Heyworth et al., 1993; el Benna et al., 1994; Dusi et al., 1995). Die zusätzlich identifizierte zytosolische Untereinheit p40phox reduziert nach Bindung an den NAD(P)H-Oxidase-Komplex die Radikalbildung (Sathyamoorthy et al., 1997). In zellfreien Rekonstitutionsassays erwies sich für die Radikalbildung ein Minimalkomplex der Untereinheiten p22phox, p47phox, p67phox und gp91phox als essentiell. Dabei müssen alle 4 Untereinheiten in einem äquimolaren Verhältnis assoziieren (Uhlinger et al., 1993; Huang et al., 1995; Wallach and Segal, 1996).

In Endothelzellen wurden erst kürzlich alle 4 essentiellen NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen (Jones et al., 1996; Meyer et al., 1999; Görlach et al., 2000). In glatten Muskelzellen konnte ein zu gp91phox homologes Protein, mox 1 (mitogen activated oxidase 1), kloniert werden, das eine NAD(P)H-Oxidase-ähnliche ROS-Bildung vermittelt (Suh et al., 1999). Die vaskulären NAD(P)H-Oxidasen zeigen jedoch funktionelle Unterschiede zum granulocytären Enzym. In Granulocyten ist die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase schnell induzierbar ("oxidative burst"), während in vaskulären Zellen die O_2^- -Bildung auf eher niedrigem konstitutiven Niveau erfolgt (Pagano et al., 1997; Hohler et al., 2000). Als Elektronendonator wird in Granulocyten NADPH bevorzugt (Curnutte et al., 1987), während in Lysaten vaskulärer Zellen die ROS-Bildung stärker durch NADH stimulierbar ist (Mohazzab et al., 1994; Griendling et al., 1994). Auf Grund dieser funktionellen Befunde wurde postuliert, daß der vaskuläre mit dem granulocytären Enzymkomplex nicht identisch sein kann. Die molekularen Grundlagen dieser funktionellen Unterschiede sind bisher jedoch noch nicht untersucht worden.

Ang II kann die vaskuläre O_2^- -Bildung und NAD(P)H-Oxidase-Aktivität in glatten Muskelzellen (Griendling et al., 1994; Rajagopalan et al., 1996), Fibroblasten (Pagano et al., 1997) und Endothelzellen (Zhang et al., 1999; Lang et al., 2000) stimulieren. Die Expression einzelner Komponenten des NAD(P)H-Oxidase-Komplexes war in glatten Muskelzellen durch Ang II erhöht (Ushio-Fukai et al., 1996). Inwiefern Ang II die Expression von NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten in Endothelzellen beeinflusst, ist bisher nicht systematisch untersucht worden. Darüber hinaus ist der Einfluß von ET-1 auf die NAD(P)H-Oxidase-Expression und -Aktivität nicht bekannt.

1.7. Proatherosklerotische oxLDL-Aufnahme in Endothelzellen

Ein wichtiges proatherosklerotisches Zielmolekül von Superoxidanionen ist das Low-Density-Lipoprotein (LDL). O_2^- oxidiert vorrangig die ungesättigten Fettsäuren der Phospholipide auf der LDL-Partikeloberfläche, aber auch das Apolipoprotein B, wodurch oxidativ modifiziertes LDL (oxLDL) gebildet wird (Steinbrecher et al., 1984). In der Frühphase der Atherogenese beeinträchtigt oxLDL die endothelabhängige Relaxation (Kugiyama et al., 1990) durch die Reduktion der endothelialen NOS-Expression und die Induktion vaskulärer ROS-Bildung (Lehr et al., 1992; Galle et al., 1995; Heinloth et al., 2000). Das oxLDL induziert die endotheliale Expression von Adhäsionsmolekülen (Khan et al., 1995) und eine erhöhte Apoptoserate (Dimmeler et al., 1997a). Außerdem fördert oxLDL die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen und die Expression von Scavenger-Rezeptoren (Rajavashisth et al., 1990; Yoshida et al., 1998). Dies begünstigt die Infiltration von Makrophagen, die oxLDL vorrangig über Scavenger-Rezeptoren unreguliert aufnehmen können, in die Intima (Steinberg, 1997). Dieser Prozess führt zur Schaumzellbildung und trägt zur Ausbildung atherosklerotischer Plaques bei (Witztum and Steinberg, 1991). Durch Wachstumsfaktor-Freisetzung stimuliert oxLDL die Proliferation von glatten Muskelzellen und trägt zur Einengung des Gefäßlumens durch Gefäßhypertrophie bei fortschreitender Atherosklerose bei (Auge et al., 1996; Chai et al., 1996). Darüber hinaus führt oxLDL zur prokoagulativen Induktion von "tissue factor", "plasminogen activator inhibitor-II" und Plättchenaggregation (Drake et al., 1991; Wada et al., 1994; Ardlie et al., 1989).

Die Senkung des körpereigenen LDL-Cholesterinspiegels und damit lokaler oxLDL-Konzentrationen durch Cholesterinsyntheseenzym (CSE)-Hemmer (bzw. HMG-CoA-Reduktase-Hemmer) verringert die Ausbildung von atherosklerotischen Plaques und verbessert signifikant die Prognose von kardiovaskulären Erkrankungen (Brown et al., 1990; 4S Group, 1994; Shepherd et al., 1995; Sacks et al., 1996; LIPID Study Group, 1998). In

Endothelzellen wird oxLDL durch den kürzlich klonierten Rezeptor LOX-1 (lectin-like oxLDL receptor 1) aufgenommen, der genetisch distinkt von den Scavenger-Rezeptoren der Makrophagen ist (Sawamura et al., 1997). LOX-1 kann durch Tumornekrosefaktor α , Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) und Schubspannung transient induziert werden (Kume et al., 1998; Murase et al., 1998). Der LOX-1-Rezeptor vermittelt eine endotheliale Phagozytose von alternden und apoptotischen Zellen (Oka et al., 1998). Kürzlich konnte LOX-1 in atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden (Chen et al., 2000; Kataoka et al., 2000). Der Einfluß der proatherosklerotischen Risikofaktoren Ang II und ET-1 auf die LOX-1-Expression in humanen Endothelzellen ist bisher nicht untersucht worden.

Darüber hinaus ist der Einfluß einer ACE-Hemmer-, AT₁-Rezeptor-Blocker oder Cholesterinsyntheseenzym (CSE)-Hemmer-Therapie auf die Genexpression von LOX-1, NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten, der endothelialen NO-Synthase (eNOS) oder des Endothelin-Systems in arteriellen Gefäße von Patienten mit KHK und im Myokard von Patienten mit Herzinsuffizienz bisher nicht untersucht worden.

2. Ziele

Das Ziel der Arbeit war, potenzielle Mechanismen der Ausbildung und Lokalisierung von atherosklerotischen Plaques auf molekularer Ebene zu untersuchen. Dadurch sollen molekulare Mechanismen der Atherogenese besser verstanden und Ansätze für antiatherosklerotische therapeutische Strategien entwickelt werden.

Schwerpunkte bildeten dabei die Untersuchung potenziell proatherosklerotischer Wirkungen biomechanischer Kräfte (Schubspannung, Dehnung), lokal erhöhter Angiotensin II (Ang II)- bzw. Endothelin-1 (ET-1)-Konzentrationen, erhöhter Apoptoseraten, erhöhtem oxidativen Streß und verstärkter Aufnahme von oxidativ modifiziertem Low-Density-Lipoprotein (oxLDL) in Gefäßzellen.

Die Ziele der spezifischen Untersuchungen waren:

1. die Identifizierung von Genen, die durch chronische arterielle oder venöse Schubspannung in humanen Endothelzellen differenziell reguliert werden,
2. die Regulation von Genen des Endothelin-Systems und von
3. pro- bzw. antiapoptotischen Genen durch Schubspannung in Endothelzellen,
4. die biomechanische Regulation von Transkriptionsfaktoren in Gefäßzellen,
5. die molekulare Struktur der NAD(P)H-Oxidase als Quelle von Superoxidanionen und oxidativem Streß und ihre Regulation durch Ang II und ET-1 in Endothelzellen,
6. die Ang II- und ET-1-vermittelte Regulation der proatherosklerotischen Aufnahme von oxLDL in Endothelzellen,
7. Wechselwirkungen zwischen dem Renin-Angiotensin- und dem Endothelin-System *in vitro* und *in vivo* und
8. die Wirkung präoperativer medikamentöser Behandlung mit ACE-Hemmern, AT₁-Rezeptorantagonisten bzw. HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren auf die Genexpression in arteriellen Biopsien von Patienten mit koronarer Herzkrankheit besser verstehen zu lernen.

Darüber hinaus wurde der Einfluß einer ACE-Hemmer-Therapie auf die Genexpression der endothelialen NO-Synthase und des Endothelin-Systems im Myokard von Patienten mit Herzinsuffizienz untersucht.

3. Material und Methoden

3.1. Endothelzellkultur

Humane Endothelzellen wurden mit einem nach Jaffe et al. (1973) modifizierten Protokoll isoliert (Morawietz et al., 1999b; Morawietz et al., 2000b). Die Isolierung der Endothelzellen aus Nabelschnurvenen erfolgte bei 37°C mit einer 0,05%igen Collagenase IV-Lösung in Dulbecco's phosphat-buffered saline (PBS) (Life Technologies) für 11 min. Die Zellen wurden anschließend mit Endothelzellmedium (Medium M199 mit 1,25 mg/ml Natriumbicarbonat, 100 mg/ml L-Glutamin, 20% Kälberserum, 15 mM HEPES, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 250 ng/ml Fungizone, pH 7,4) ausgespült, für 6 min bei 250 g zentrifugiert und in Endothelzellmedium resuspendiert. Um die Variabilität der Endothelzellpräparationen zu minimieren, wurden die Endothelzellen der unterschiedlichen Nabelschnuren jeden Tages gemischt und auf für 1 h mit einer 1%igen Gelatinelösung vorbehandelten Petrischalen (Greiner) plattiert. Die Endothelzellen konnten sich anschließend für 1,5 h in einen CO₂-Inkubator (37°C, 100% Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂-Atmosphäre) anheften. Die Zellen wurden gewaschen (Anreicherung auf > 99% Endothelzellen, Nachweis durch FACS-Analyse mit von-Willebrand-Faktor), und in Endothelzellmedium mit 16,7 ng/ml Endothelzellwachstumsfaktor (C.C.Pro, Neustadt) bis zur Konfluenz (ca. 4-5 Tage) im Inkubator kultiviert. Auf einer 94 x 16 mm-Petrischale wurden ca. 10⁶ Endothelzellen kultiviert. Bei anschließender Stimulation mit Angiotensin II oder Endothelin-1 wurden die Zellen zuvor in Endothelzellkulturmedium mit 0,5% Serum für 24 h inkubiert.

3.2. Kultivierung glatter Gefäßmuskelzellen

Primärkulturen glatter Muskelzellen (vascular smooth muscle cells, VSMC) wurden aus der Aorta der neugeborenen Ratte von Peter Jones (University of Southern California, Los Angeles, CA) isoliert. Von diesen Primärkulturen wurde die Zelllinie R22D etabliert (Jones et al., 1979) und in Passage 15 freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die glatten Muskelzellen wurden in VSMC-Medium (Minimum essential medium mit 10% fetalem Rinderserum, 2% Tryptosephosphatnährmedium, 50 U/ml Penicillin und 50 U/ml Streptomycin) in einen CO₂-Inkubator (37°C, 100% Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂-Atmosphäre) bis zur Konfluenz kultiviert (Morawietz et al., 1999a). In den Untersuchungen wurden Zellen der Passagen 17-25 verwendet.

3.3. Präparation von Granulocyten

Die Präparation von humanen Granulocyten erfolgte aus heparinisiertem Blut durch Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation mit einem nach Biggers and McFeely (1963) modifizierten Protokoll. Es wurden 5 ml einer 1:1-Blutverdünnung in Dulbecco's PBS (Life Technologies) mit 3 ml einer Ficoll-Lösung (Dichte 1,085 g/cm³) beschichtet. Die Proben wurden für 20 min mit 1800 g bei Raumtemperatur zentrifugiert, um die Erythrocyten zu sedimentieren. Die in der Mitte des Röhrchens angereicherten Granulocyten wurden abgenommen und mit einem Volumen PBS verdünnt. Die isolierten Granulocyten wurden erneut sedimentiert (1000 g, Raumtemperatur, 20 min) und für eine nachfolgende RNA-Isolation oder den Cytochrom c-Assay im spezifischen Puffer resuspendiert.

3.4. Gewebsbiopsien

Gewebsbiopsien wurden direkt nach der Entnahme präpariert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert. Die Untersuchung von humanen Gefäß- und Myokard-Biopsien erfolgte nach vorheriger Information und Zustimmung der Patienten und wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät genehmigt. Die Entnahme von *Arteria mammaria interna*- und rechten atrialen Myokard-Biopsien erfolgte bei elektiver koronarer Bypass-Operation. Die Myokard-Biopsien des linken Ventrikels wurden aus explantierten Herzen bei Herztransplantationen, sowie bei Im- bzw. Explantation eines ventrikulären Assist-Systems (VAD) gewonnen. Die Mehrzahl der untersuchten humanen Biopsien wurden uns freundlicherweise von der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie der MLU Halle-Wittenberg (Leiter: Prof. Zerkowski) zur Verfügung gestellt. Darüber hinaus untersuchten wir linksventrikuläre Myokard-Biopsien von Spenderherzen, die aus technischen Gründen nicht transplantiert wurden, sowie von Patienten mit Herzinsuffizienz, die sich in den 80er Jahren einer Herztransplantation unterzogen. Diese Proben erhielten wir freundlicherweise von Prof. Brodde (Institut für Pharmakologie und Toxikologie der MLU) und von Prof. Eschenhagen (Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf/Klinische Pharmakologie und Klinische Toxikologie, Universität Erlangen-Nürnberg). Die Biopsien vor bzw. nach Einbau eines ventrikulären Assist-Systems wurden uns freundlicherweise von Prof. Körfer (Klinik für Thorax- und Kardiovaskularchirurgie, Herz- und Diabeteszentrum NRW, Bad Oeynhausen) zur Verfügung gestellt.

Nierengewebe von C57BL/6J-Mäusen mit normaler Fütterung oder fettreicher Western type diet (Harlan Teklad TD 88137, 42% Milhfett, 0,15% Cholesterol) mit bzw. ohne zusätzlicher Gabe eines ET_A-selektiven Rezeptorantagonisten (LU135252, Knoll AG,

50 mg/kg/d) für 30 Wochen wurden uns von Dr. Barton (Kantonsspital Zürich) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3.5. Patientenkollektive

Die klinischen Charakteristika und die medikamentöse Therapie der Patienten in den klinischen Untersuchungen wurde retrospektiv ermittelt. In Untersuchungen zum Einfluß von ACE-Hemmer-, AT₁-Rezeptor-Blocker- bzw. CSE-Hemmer-Therapie auf die Genexpression von Zielgenen wurden jeweils Patientenkollektive zusammengestellt, die sich lediglich in der medikamentösen Therapie, jedoch nicht in der Begleittherapie oder weiteren klinischen Parametern unterschieden. Beispielhaft sind die klinischen Charakteristika der Patientenkollektive zur Untersuchung des Einflusses von chronischer präoperativer ACE-Hemmer-Therapie auf die LOX-1-mRNA-Expression (Tab. 1) und von CSE-Hemmer-Thera-

Tab. 1: Patientenkollektiv zur Untersuchung des Einflusses von ACE-Hemmer-Therapie auf die LOX-1-mRNA-Expression in *Arteria mammaria*-Biopsien von Patienten mit KHK.

	ohne ACE-Hemmer (n = 12)	mit ACE-Hemmer (n = 12)	P
Geschlecht, männl. (%)	9 (75%)	10 (83%)	0,748
Alter, Jahre	57,5 ± 2,3	61,0 ± 1,9	0,253
Größe, cm	169,1 ± 2,2	170,0 ± 2,1	0,763
Gewicht, kg	74,5 ± 4,4	81,3 ± 3,9	0,260
NYHA-Klassifikation	2,2 ± 0,2	2,2 ± 0,3	0,977
zent. Venendruck, mm Hg	7,6 ± 1,3	6,0 ± 0,8	0,301
syst. Blutdruck, mm Hg	116,3 ± 5,1	113,1 ± 5,1	0,664
diast. Blutdruck, mm Hg	59,9 ± 3,0	62,3 ± 2,7	0,569
Ejektionsfraktion, %	63,8 ± 4,7	62,5 ± 4,5	0,849
Herzfrequenz, min ⁻¹	71,1 ± 3,0	70,2 ± 3,7	0,856
Medikation, n (%)			
ACE-Hemmer	0 (0%)	12 (100%)	< 0,001
AT ₁ -Blocker	0 (0%)	0 (0%)	1,000
CSE-Hemmer	3 (25%)	1 (8%)	0,502
Ca-Antagonisten	1 (8%)	3 (25%)	0,502
β-Blocker	5 (42%)	7 (58%)	0,505
Diuretika	1 (8%)	3 (25%)	0,502
Nitrate	9 (75%)	9 (75%)	0,977
Herzglykoside	1 (8%)	1 (8%)	0,977
Antidiabetika	2 (17%)	2 (17%)	0,977

pie auf die gp91phox-mRNA-Expression in *Arteria mammaria*-Biopsien von Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) (Tab. 2), sowie von ACE-Hemmer-Therapie auf die eNOS-mRNA-Expression in rechten atrialen Myokardbiopsien-Biopsien von Patienten mit KHK (Tab. 3) dargestellt. Die von den behandelnden Ärzten verschriebene ACE- bzw. CSE-Hemmer-Dosis betrug in diesen Untersuchungen $31 \pm 5\%$ (Tab. 1), $83 \pm 11\%$ (Tab. 2) und $33 \pm 6\%$ (Tab. 3) der Zieldosis in kürzlichen Megastudien. Alle hypertensiven Patienten ohne ACE-Hemmer-Therapie erhielten eine adäquate antihypertensive Standardtherapie mit Calcium-Antagonisten, β -Blockern und/oder Diuretika.

Tab. 2: Patientenkollektiv zur Untersuchung des Einflusses von Cholesterinsyntheseenzym (CSE)-Hemmer-Therapie auf die gp91phox-mRNA-Expression in *Arteria mammaria*-Biopsien von Patienten mit KHK.

	ohne CSE-Hemmer (n = 8)	mit CSE-Hemmer (n = 6)	P
Geschlecht, männl. (%)	6 (75%)	4 (67%)	0,852
Alter, Jahre	$60,4 \pm 1,9$	$60,0 \pm 1,9$	0,894
Größe, cm	$170,1 \pm 3,5$	$165,2 \pm 1,4$	0,491
Gewicht, kg	$79,0 \pm 6,9$	$75,5 \pm 3,7$	0,694
NYHA-Klassifikation	$2,3 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,2$	0,241
zent. Venendruck, mm Hg	$7,1 \pm 1,2$	$9,2 \pm 1,4$	0,296
syst. Blutdruck, mm Hg	$114,1 \pm 5,7$	$116,2 \pm 12,0$	0,868
diast. Blutdruck, mm Hg	$64,4 \pm 2,7$	$59,6 \pm 5,1$	0,383
Ejektionsfraktion, %	$70,0 \pm 3,2$	$58,7 \pm 6,1$	0,101
Herzfrequenz, min^{-1}	$71,1 \pm 3,3$	$74,8 \pm 5,6$	0,566
Medikation, n (%)			
CSE-Hemmer	0 (0%)	6 (100%)	< 0,001
ACE-Hemmer	2 (25%)	1 (17%)	0,852
AT ₁ -Blocker	0 (0%)	0 (0%)	1,000
Ca-Antagonisten	0 (0%)	1 (17%)	0,662
β -Blocker	3 (38%)	3 (50%)	0,755
Diuretika	1 (13%)	1 (17%)	0,950
Nitrate	7 (88%)	4 (67%)	0,573
Herzglykoside	0 (0%)	1 (17%)	0,662
Antidiabetika	0 (0%)	1 (17%)	0,662

Tab. 3: Patientenkollektiv zur Untersuchung des Einflusses von ACE-Hemmer-Therapie auf die eNOS-mRNA-Expression in rechten atrialen Myokardbiopsien-Biopsien von Patienten mit KHK.

	ohne ACE-Hemmer (n = 33)	mit ACE-Hemmer (n = 23)	P
Geschlecht, männl. (%)	23 (70%)	13 (57%)	0,408
Alter, Jahre	62,1 ± 1,7	65,1 ± 1,8	0,236
NYHA-Klassifikation	2,3 ± 0,2	2,9 ± 0,2	0,100
zentraler Venendruck, mm Hg	9,5 ± 0,7	10,3 ± 1,1	0,483
syst. Blutdruck, mm Hg	130,5 ± 4,9	137,3 ± 5,1	0,206
diast. Blutdruck, mm Hg	75,6 ± 2,6	77,6 ± 2,1	0,566
Ejektionsfraktion, %	60,8 ± 3,7	55,0 ± 4,2	0,302
Herzfrequenz, min ⁻¹	87,3 ± 2,8	82,4 ± 3,2	0,338
Medikation, n (%)			
ACE-Hemmer	0 (0%)	23 (100%)	< 0,001
AT ₁ -Blocker	0 (0%)	0 (0%)	1,000
CSE-Hemmer	5 (15%)	3 (13%)	0,900
Ca-Antagonisten	8 (24%)	6 (26%)	0,913
β-Blocker	5 (15%)	9 (39%)	0,130
Diuretika	13 (39%)	7 (30%)	0,576
Nitrate	24 (73%)	19 (83%)	0,536
Herzglykoside	10 (30%)	6 (26%)	0,796
Antikoagulanzen	21 (64%)	15 (65%)	0,927

Der Einfluß mechanischer Herzentlastung herzinsuffizienter Patienten vor der Transplantation durch ventrikuläre Assist-Systeme (VAD) wurde bei 10 männlichen Patienten (8 mit dilatativer, 2 mit ischämischer Kardiomyopathie) im Herz- und Diabeteszentrum NRW Bad Oeynhausen untersucht. Zum Zeitpunkt der VAD-Implantation hatten diese ein Alter von 53±4 Jahren. Die hämodynamischen Daten wurden zum Zeitpunkt der letzten echokardiographischen Bestimmung der Ejektionsfraktion (24±1%) vor der VAD-Implantation bestimmt. Als VAD wurden TCI HeartMate (Thermo Cardiosystems, Inc., n=3), Novacor (Baxter Healthcare Corp., n=6), oder Thoratec (Thoratec Laboratories, Inc., n=1) genutzt. Für eine biventrikuläre Unterstützung wurde bei 2 Patienten ein zusätzliches rechtes VAD implantiert. Die Patienten wurden durchschnittlich 103±15 Tage (36 bis 169 Tage) durch ein VAD entlastet. Der Herzindex verbesserte sich durch die VAD-Entlastung von 1,9±0,2 l/min/m² auf 2,9±0,3 l/min/m² (P<0,05). Der Pulmonalkapillardruck verringerte sich durch VAD-Entlastung von 29±2 mmHg vor VAD-Implantation auf 14±3 mmHg (P<0,05) bei VAD-Explantation, während sich der mittlere Aortendruck von 69±3 mmHg auf 78±3 mmHg (P=0,058, nicht signifikant) erhöhte. Alle Patienten wurden in diesem Zeitraum mit ACE-Hemmern behandelt.

3.6. Applikation von Schubspannung auf Endothelzellen

Die Applikation von laminarer Schubspannung auf konfluente Endothelzellkulturen erfolgte mit Hilfe eines nach (Sdougos et al., 1984) modifizierten Plattenkegel-Viskometers (Morawietz et al., 2000b; Schubert et al., 2000). Die Plattenkegel-Viskometer-Apparatur wurde in Zusammenarbeit mit dem Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung und dem Institut für Biophysik der Medizinischen Fakultät der MLU etabliert. Sie besteht aus einer Petrischalenhalterung, einem drehbaren Plattenkegel aus Polycarbonat mit Justiereinrichtung, einer Motor-Getriebe-Kombination und einer Steuereinrichtung zur stufenlosen Einstellung der Geschwindigkeit des Plattenkegels. Für die Applikation von laminarer Schubspannung hat der Plattenkegel einen Winkel α von $0,5^\circ$ (bei einem Durchmesser von 86 mm). In die Spitze des Plattenkegels wurde ein Teflonstück von 10 μm Länge (Durchmesser 1 mm) eingesetzt, um ein eventuelles Aufsetzen des Plattenkegels auf die Endothelzellen zu verhindern. Die Plattenkegel-Viskometer-Apparatur ist schematisch in Abb. 5 dargestellt.

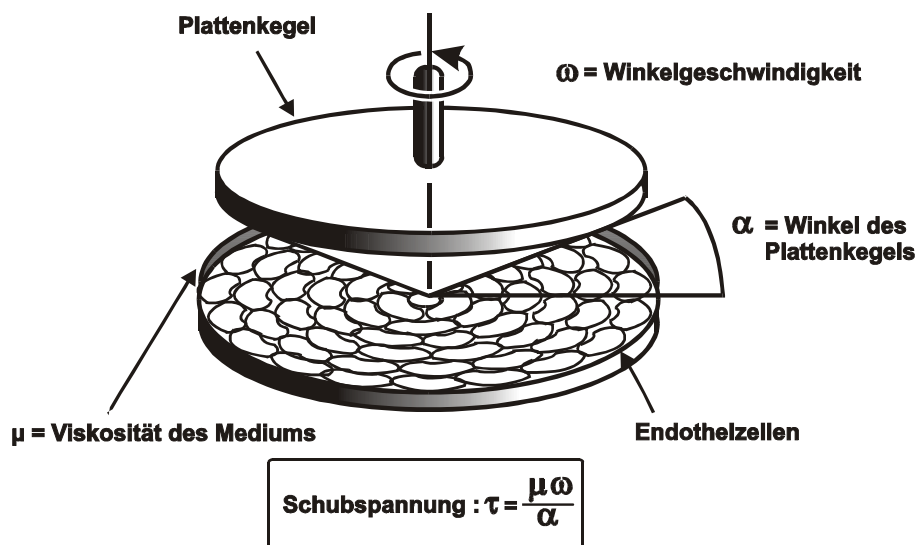


Abb. 5: Schematische Darstellung der Plattenkegel-Viskometer-Apparatur. Die Applikation von laminarer Schubspannung auf kultivierte Endothelzellen erfolgt durch einen rotierenden Plattenkegel mit einem Winkel α von $0,5^\circ$. Die Schubspannung ist außerdem von der Viskosität des Mediums und der Winkelgeschwindigkeit abhängig.

Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Endothelzellen mit frischem Endothelzellmedium ohne (bei Schubspannung von 1 bis 10 dyn/cm^2 , d.h. 0,1 bis 1 N/m^2) bzw. mit 5% Dextran (bei Schubspannung von 15 bis 50 dyn/cm^2 , d.h. 1,5 bis 5 N/m^2) für 1 h stationär kultiviert, in die Plattenkegel-Apparatur eingesetzt, der Kegel über die Zellen abgesenkt und die spezifische Schubspannung am Potentiometer der Steuerung durch

Einstellung der entsprechenden Winkelgeschwindigkeit ausgewählt. Die Applikation von laminarer Schubspannung auf kultivierte Endothelzellen erfolgt durch einen rotierenden Plattenkegel mit einem Winkel α von $0,5^\circ$. Die Schubspannung ist neben dem Winkel des Plattenkegels von der Viskosität des Mediums und der Winkelgeschwindigkeit abhängig. Die Zugabe von Dextran (Sigma, MG 71,4) erhöht die Viskosität des Endothelzellmediums 2,95-fach von $0,007 \text{ dyn} \cdot \text{s/cm}^2$ auf $0,02065 \text{ dyn} \cdot \text{s/cm}^2$ und vermeidet einen Medienverlust durch zu hohe Fliehkräfte. Bei jeder Probe wurde eine zeitgleiche interne stationäre Kontrolle mit gleichen Medium (mit bzw. ohne Dextran) analysiert.

3.7. Dehnung glatter Muskelzellen

Für die Dehnungsexperimente wurden glatte Muskelzellen der neonatalen Rattenaorten-Zelllinie R22D in 6-well-Platten (5 cm^2 pro well) mit elastischen Silikonmembranen (Flex I, Flexcell Corp., McKeesport, PA), die in der Mehrzahl der Experimente mit Typ-I-Kollagen-beschichtet waren, bis zur Konfluenz in VSMC-Medium mit 10% Serum kultiviert. Die Zellen wurden anschließend für 72 h in serumfreiem Medium: Minimum essential medium, 0,5 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA, fraction V, fatty acid poor, Miles Inc., Naperville, IL), 0,5 $\mu\text{g/ml}$ apo-Transferrin, 2% Tryptosephosphatnährmedium, 50 U/ml Penicillin, 50 U/ml Streptomycin inkubiert. Das serumfreie Medium wurde täglich bzw. 3 h vor Beginn des Dehnungsexperiments erneuert. Bei Dehnungsexperimenten mit unterschiedlichen extrazellulären Matrixproteinen wurden konfluente glatte Muskelzellen auf konventionellen Plastikpetrischalen durch Trypsinbehandlung abgelöst und das Trypsin mit serumhaltigen VSMC-Medium inaktiviert. Die Zellen wurden anschließend für 5 min bei 1000 g zentrifugiert und mit serumfreiem Medium gewaschen. Die Zellen einer 94 x 16 mm-Petrischale konnten sich dann in serumfreiem Medium auf je einer 6-well-Platte mit Typ-I-Kollagen (Col I)-, Pronectin (FN)- oder Laminin (LN)-beschichteten Silikonmembranen über Nacht anheften. Die zyklische mechanische Dehnung der glatten Muskelzellen erfolgte durch rhythmische Applikation eines Vakuums von 1 Hz in einer Flexcell-Dehnungsapparatur (Flexcell Corp., McKeesport, PA) (Abb. 6).

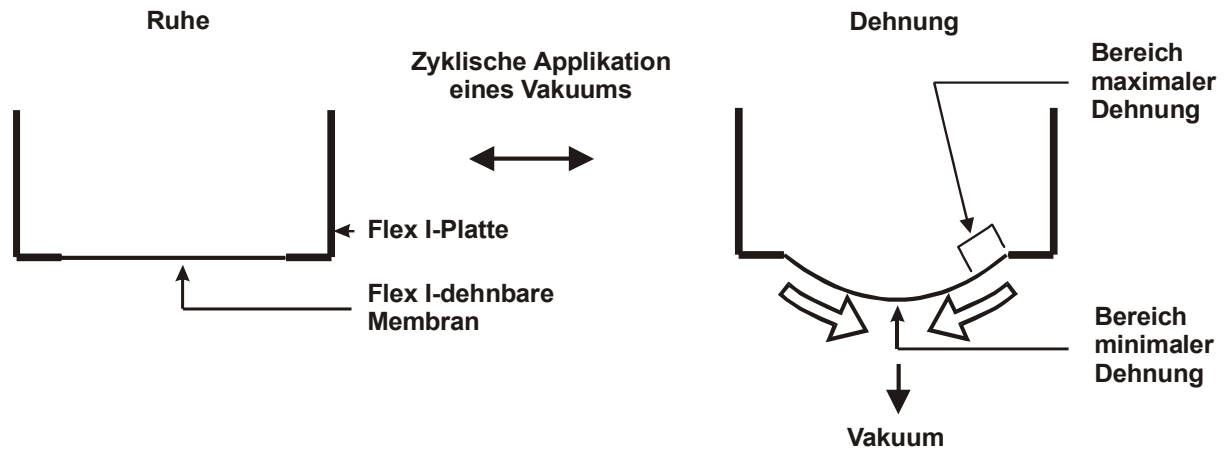


Abb. 6: Dehnung glatter Muskelzellen auf elastischen Silikonmembranen durch zyklische Applikation eines Vakuums in der Flexcell-Apparatur. Die Dehnungsamplitude kann durch Variation des computergesteuerten Vakuums modifiziert werden.

3.8. RNA-Präparation

Die RNA wurde aus Endothelzellen und Gewebsbiopsien mit Hilfe der CsCl-Methode isoliert (Chirgwin et al., 1979). Dabei wurden die Endothelzellen in Guanidinisothiocyanat (GTC)-Lösung (4 M GTC, 1% Sarcosyl, 25 mM Na-Acetat, pH 6,0, 1 mM EDTA, pH 6,5, 1 M β -Mercaptoethanol) aufgeschlossen. Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Gewebeproben wurden mechanisch pulverisiert und anschließend in GTC-Lösung mit einem Ultraturrax (IKA-Labortechnik) homogenisiert. Die RNA wurde durch CsCl-Zentrifugation bei 150.000 g und 22°C für 21 h sedimentiert, mit Ethanol zweimal gefällt und in Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser gelöst. Aus glatten Muskelzellen wurde die RNA mit Hilfe des RNA STAT-60 reagent (Tel-Test "B", Inc.) isoliert. Die Konzentration der RNA-Lösung wird spektrophotometrisch bestimmt und die Integrität der RNA durch Agarosegel-Elektrophorese überprüft (Sambrook et al., 1989). Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.9. Reverse Transkription

Für eine nachfolgende Amplifikation von Zielgenen wurde RNA durch reverse Transkription (RT) in cDNA umgeschrieben. Die RT erfolgte mit random hexamer-Primern und Super-Script II RNase H⁻ reverse transcriptase (Life Technologies) (Morawietz et al., 2000a, b).

RT-Protokoll:

RNA	≥ 100 ng
random hexamer-Primer 100 ng/μl	4 μl
DEPC-H ₂ O	ad 15,5 μl

Inkubation des Ansatzes für 3 min bei 70°C, Abkühlung auf 4°C, anschließend Zugabe von:

5 × first strand buffer	5 μl
dNTP (je 12,5 mM)	1 μl
Dithiothreitol (DTT, 10 mM)	2,5 μl
RNase OUT™ Ribonuclease Inhibitor (40 U/μl)	0,5 μl
SuperScript™ II reverse Transkriptase (2 U/μl)	<u>0,5 μl</u>
	<u>25 μl</u>

Inkubation für 1 h bei 42°C, 3 min bei 95°C, Abkühlung auf 4°C.

3.10. Polymerasekettenreaktion

Die Methode der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde zur Amplifikation revers transkribierter cDNA genutzt (Mullis and Faloona, 1987).

PCR-Protokoll:

RT-Ansatz mit cDNA	4-15 μl
10 × <i>Taq</i> -Reaktionspuffer	5 μl
dNTP (je 1 mM)	6 μl
sense-Primer (20 pmol/μl)	1 μl
antisense-Primer (20 pmol/μl)	1 μl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (4 U)	0,5 μl
steriles deionisiertes Wasser	ad 50 μl

Dieser Ansatz wurde mit ca. 50 μl Mineralöl (3 Tropfen) überschichtet und die cDNA nach einer initialen Denaturierung bei 95°C für 1 min mit dem spezifischen PCR-Programm durch zyklisches Denaturieren (95°C, 30 sec), Annealing (30 sec bei primerspezifischer Annealing-Temperatur) und DNA-Synthese (72°C, 30 sec) im Trio-Thermoblock (Biometra) amplifiziert. Der Ansatz wurde anschließend für 3 min bei 72°C inkubiert und auf 4°C abgekühlt. Die verwendeten genspezifischen Primersequenzen und PCR-Protokolle sind in Tab. 4 zusammengefaßt.

Tab. 4: Genspezifische Primersequenzen und PCR-Protokolle.

Gen	Primer	5'-3'-Primersequenzen	Annealing-Temperatur	PCR-Zyklen
18SrRNA	sense	GTTGGTGGAGCGATTTGTCTGG	60°C	11
	antisense	AGGGCAGGGACTTAATCAACGC		
Bak	sense	CTGTTTTTACCGCCATCAGCAGG	60°C	33
	antisense	CTCTCAAACAGGCTGGTGGCAATC		
Bax	sense	ACCCGAGCTGGCCCTGGAC	60°C	33
	antisense	ATGGTGAGCGAGGCGGTGAG		
Bcl-2	sense	GACTTCTTCCGCCGCTACCG	60°C	32
	antisense	GACAGCCAGGAGAAATGAAAC		
Bcl-x _L	sense	GGTGGTTGACTTTCTCTCCTAC	58°C	32
	antisense	GAAAAGTATCCCAGCCGCC		
ECE-1	sense	GAAGCGGCTGGTGGTGTGGTG	62°C	36
	antisense	GGTTGGCCTTGATCCAGC		
eNOS	sense	GGAACCTGTGTGACCCTC	65°C	40
	antisense	CCACGTCATACTCATCCA		
ET _A	sense	CACTGGTTGGATGTGTAATC	58°C	38
	antisense	AGAGGGAACCAGCAAAGAGC		
ET _B	sense	CGAGCTGTTGCTTCTTGAGTAG	69°C	40
	antisense	ACGGAAGTTGTCATATCCGTGAT		
Fas + Fas-Exo6Del	sense	GGACCCAGAATACCAAGTG	56°C	38
	antisense	CTGTTCTGCTGTGT		
GAPDH	sense	CATCACCATCTTCCAGGAGCG	60°C	18
	antisense	TGACCTTGCCCACAGCCTTG		
gp91phox	sense	CAACAAGAGTTCGAAGACAA	59°C	44
	antisense	CCCCTTCTTCTTCATCTGTA		
LOX-1	sense	CGGCAACAAGCAGAAGAAGC	65°C	44
	antisense	TGGGCTCTCATGTTTGGCAC		
Mcl-1	sense	CGCCATCGTGTCTCCGGAG	60°C	33
	antisense	AAGGCCGTCTCGTGGTTGC		
p22phox	sense	GATCGAGTGGGCCATGT	62°C	40
	antisense	TGCTTGATGGTGCCTCC		
p47phox	sense	AAGTGGTTTGACGGGCAG	60°C	40
	antisense	TGGACGGAAAGTAGCCTG		
p67phox	sense	ATGCCTTCAGTGCCGTCCAG	66°C	41
	antisense	TGCTTCCAGACACACTCCATCG		
PPET-1	sense	TGCTCCTGCTCGTCCCTGATGGATAAAGA	65°C	40
	antisense	GGGTCACATAACGCTCTCTGGAGGGCTT		
Pro-ANP	sense	GCATTCCAGCTCCTAGGTCAGA	60°C	31
	antisense	GGCTCCAATCCTGTCCAT		
tfcd	sense	TTTGCTCTGGCTCTCCGTGACC	60°C	40
	antisense	TGAGGACAGTGGCAGCATAGGG		

3.11. Agarosegel-Elektrophorese

Die Auftrennung von DNA bzw. die Kontrolle der RNA-Integrität erfolgte in 0,8%igen Agarosegelen mit Ethidiumbromid (100 ng/ml) in Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer (89 mM Tris-Base, 89 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA, pH 7,5) bei 8-10 V/cm Laufstrecke in Standard-Elektrophorese-Apparaturen (Sambrook et al., 1989). Die Nukleinsäuren wurden dabei mit 0,1 Volumen Probenpuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 50% Glycerol, 0,25% Bromphenolblau) versetzt. Die Länge linearer DNA-Fragmente wurde mit Hilfe parallel aufgetrennter DNA-Längenstandards (100 bp bzw. 1 kb-Leiter, Life Technologies) bestimmt. Die DNA bzw. RNA wurde mit Hilfe eines UV-Transilluminators nachgewiesen und mit Polaroidfilm Typ 665 fotografiert.

3.12. Elution von Nukleinsäuren

DNA- oder RNA-Fragmente spezifischer Größe können nach Elektrophorese auf dem UV-Transilluminator aus dem Agarosegel herausgeschnitten und die Nukleinsäuren durch Elution isoliert werden. Die DNA-Fragmente im Gelstück wurden vorrangig mit dem QIAEX II- Agarosegel-Extraction-Kit (QIAGEN) in NaI-Puffer gelöst und die DNA an Silica-Partikel gebunden und eluiert. *In vitro*-transkribierte cRNA-Standards (3.18.) und ein Teil der DNA-Fragmente wurde durch Elektroelution aus dem Gelstück in einen Dialyseschlauch (Spectra/Por®6, MWCO 1.000) in einer Elektrophorese-Apparatur mit anschließender Ethanolpräzipitation isoliert.

3.13. Klonierung von DNA-Fragmenten

Die Klonierung von eluierten PCR-Fragmenten in Plasmidvektoren erfolgte nach Amplifikation mit Cloned *Pfu*-DNA-Polymerase mit dem pCR-Script™ SK+ Cloning Kit (Stratagene) oder mit dem TOPO™ TA Cloning® Kit (pCR®II-TOPO, Invitrogen). Die in den Klonierungsvektor ligierten PCR-Fragmente wurden in kompetente Bakterien (Epicurian Coli XL1-Blue MRF'Kan, Stratagene) transformiert. Die rekombinanten Bakterien wurden durch 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal)-Selektion auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin, 50 µl X-Gal-Stammlösung (50 mg/ml) und 25 µl Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG)-Stammlösung (100 mM) identifiziert.

3.14. Plasmid-DNA-Präparation

Rekombinante Bakterien wurden in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin über Nacht bei 37°C, 225 rpm kultiviert. Nach dem Erreichen der stationären Phase wurden die Bakterien sedimentiert (10 min, 5000 rpm). Die Plasmid-DNA aus kleineren Bakterienkulturvolumina (1,5 ml) wurde mit der “Boiling”-Minipräparation isoliert (Holmes and Quigley, 1981). Die Plasmid-DNA-Isolation aus größeren Volumina (50-100 ml Kultur) erfolgte durch Modifikation der Methode der basischen Lyse (Sambrook et al., 1989) mit anschließender Reinigung durch QIAGEN-Säulen (QIAGEN-Midi-Prep-Kit, QIAGEN).

3.15. DNA-Sequenzierung

Eluierte DNA-Fragmente wurden überlappend auf beiden Strängen durch Modifikation der Methode von Sanger et al. (1977) mit dem Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer) sequenziert. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proben und die Auswertung der Sequenzierung erfolgte im Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg mit einem ABI Prism 373 DNA Sequencer (Perkin Elmer). Die DNA-Sequenzen wurden mit der DNA-Programm GeneRunner (Hastings Software) analysiert und mit DNA-Sequenz-Datenbanken (GenBank, Altschul et al., 1990) verglichen. Die Bestimmung homologer Aminosäuren der abgeleiteten Aminosäuresequenz mit bekannten Sequenzen erfolgte nach Dayhoff (1978).

3.16. Restriktionsanalyse von DNA

Die DNA wurde mit Hilfe von Restriktionsenzymen sequenzspezifisch gespalten. Dabei wurde die DNA mit dem Restriktionsenzym (1 U Enzym/µg DNA) im spezifischen Restriktionspuffer für 2 h bei 37°C inkubiert. Der Restriktionsansatz wurde anschließend im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

3.17. Konstruktion von internen Standards für die kompetitive PCR

Für die Quantifizierung der mRNA-Expression von Zielgenen wurden durch Modifizierung einer Linker-Primer-PCR-Methode (Förster, 1994) intern deletierte cDNA-Standards konstruiert. Im ersten Schritt wurde ein genspezifisches cDNA-Fragment durch PCR mit sense- und antisense-Primern amplifiziert. Im zweiten Schritt erfolgt die Amplifikation eines verkürzten genspezifischen Fragmentes mit einem Linker- und dem antisense-Primer. Der Linker-Primer hat eine Länge von 30 bp, wobei die 10 bp seines 5'-Endes den 10 bp des 3'-Endes des sense-Primers entsprechen. Die weiteren 20 bp des Linker-

Primers lagern sich an eine Sequenz an, die sich auf dem cDNA-Fragment ca. 100 bp in 3'-Richtung der Bindungsstelle des im ersten Amplifikationsschritt verwendeten sense-Primer befindet. In einer dritten PCR-Reaktion mit sense- und antisense-Primern entsteht durch Bindung des sense-Primers an die 10 bp der Linker-Primer-Sequenz ein intern verkürzter Standard, der von den originalen sense- und antisense-Primern begrenzt wird. Für die relative Quantifizierung der 4 NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten gp91phox, p22phox, p47phox und p67phox wurde durch überlappende Linker-Primer-PCR ein intern verkürzter Multistandard konstruiert. Dieser ist durch die benachbarten sense- bzw. antisense-Primer aller Untereinheiten begrenzt. Die Identität aller cDNA-Standards wurde durch Klonierung und Sequenzierung nachgewiesen. Die Standards wurden anschließend in cRNA *in vitro*-transkribiert (3.18.).

3.18. *In vitro*-Transkription

Die intern deletierten Standards für die kompetitive PCR wurden durch *in vitro*-Transkription in den komplementären cRNA-Strang umgeschrieben (RNA Transcription Kit, Stratagene). Die cRNA wurde anschließend durch Elektroelution von der als Vorlage eingesetzten cDNA gereinigt. Die RNA-Konzentration wurde densitometrisch bei 260 nm ermittelt. Eine RNA-Verdünnung (10 µg/ml) wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.19. Kompetitive reverse Transkriptions-Polymerasekettenreaktion

Die Quantifizierung der mRNA niedrig exprimierter Gene erfolgte durch kompetitive reverse Transkriptions-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR). Die Zugabe eines intern deletierten Standards erlaubt eine interne Normalisierung von ansatzspezifischen Variationen in RT- oder PCR-Reaktionen (Wang et al., 1989). Für jede Probe wurden 4-6 RT-Ansätze von identischen probenspezifischen RNA-Mengen (100 ng) mit jeweils unterschiedlichen Mengen einer 1:3-Verdünnungsreihe der Standard-cRNA in cDNA revers transkribiert (3.9.). Von diesen RT-Reaktionen wurden gleichen Volumina durch PCR mit genspezifischen Primern amplifiziert (3.10.). In jeder Reaktion kompetieren probenspezifische und Standard- Moleküle um die PCR-Primer. Die PCR-Reaktionen werden anschließend in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt (3.11.), fotografiert (Polaroidfilm Typ 665) und densitometrisch ausgewertet (Personal Densitometer, Molecular Dynamics). Die optische Dichte der intern verkürzten Standard-DNA-Fragmente wurde durch einen Korrekturfaktor normalisiert, der sich aus dem Längenverhältnis der PCR-Fragmente von Probe und Standard ergibt (z.B. PPET-1: probenspezifisch 461 bp / Standard 355 bp = 1,298). Der dekadische Logarithmus

des Quotienten aus normalisiertem Standard- und probenspezifischen PCR-Fragment wurde graphisch gegen die Menge an cRNA-Standard aufgetragen (SigmaPlot scientific graphing software, Jandel Corp.). Am Äquivalenzpunkt sind die RNA-Konzentrationen von Probe und Standard identisch und erlauben eine Quantifizierung der mRNA-Expression.

3.20. SmaRT-PCR

Zur kostengünstigeren und schnelleren mRNA-Quantifizierung wurde die Methode der seriellen multistandard-assistierten RT-PCR (smaRT-PCR) am Beispiel des ET_B-Rezeptors entwickelt (Szibor and Morawietz, 2001). Im Gegensatz zur klassischen kompetitiven PCR wurden dabei vier seriell intern deletierte Standards durch Linker-Primer-PCR konstruiert. Die mRNA-Quantifizierung eines Zielgens in einer definierten RNA-Menge erfolgt bei der smaRT-PCR in nur einem Reaktionsgefäß mit vier seriell deletierten und verdünnten internen Standards, die gemeinsam revers transkribiert (3.9.) und danach durch PCR (3.10.) amplifiziert werden. Die smaRT-PCR-Reaktion wird anschließend durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt (3.11.) und die mRNA-Expression in Analogie zur kompetitiven RT-PCR graphisch bestimmt (3.19.). Das Prinzip der Methode ist in Abb. 7 dargestellt.

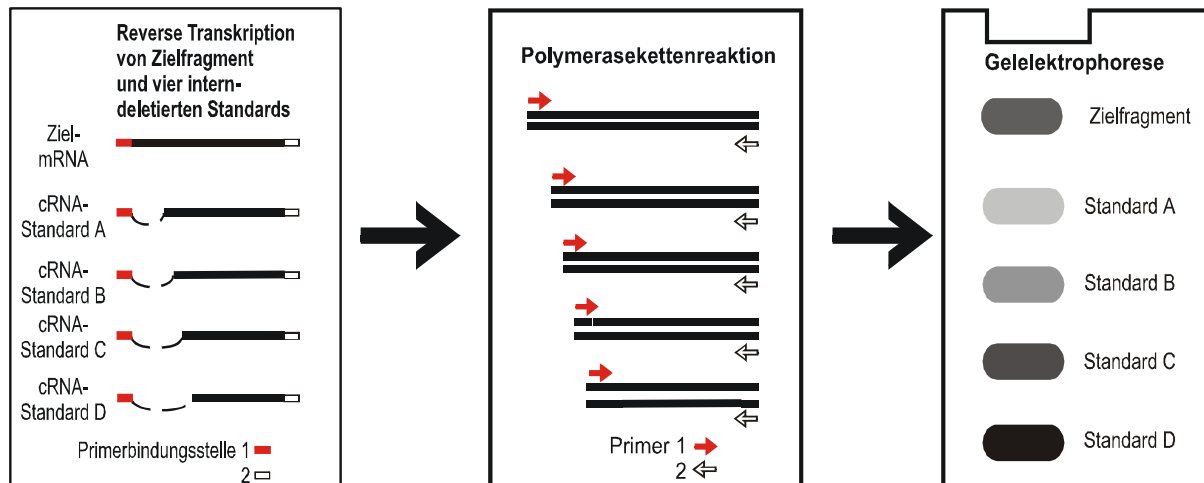


Abb. 7: Prinzip der Methode der smaRT-PCR. Die klassische kompetitive RT-PCR wurde durch Konstruktion von vier seriell intern deletierten cRNA-Standards modifiziert. Die mRNA-Quantifizierung eines Zielgens in einer definierten probenspezifischen RNA-Menge erfolgt bei der smaRT-PCR in einem Reaktionsgefäß mit den seriell deletierten und verdünnten internen Standards. RNA und Standards werden gemeinsam revers transkribiert und anschließend durch PCR amplifiziert. Die smaRT-PCR-Reaktion wird durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und die mRNA-Expression in Analogie zur kompetitiven RT-PCR nach Densitometrie graphisch bestimmt.

3.21. RAP-PCR

Differenziell durch arterielle oder venöse Schubspannung exprimierte endotheliale Gene wurden durch "RNA arbitrarily primed-polymerase chain reaction" (RAP-PCR) identifiziert. Das Prinzip der RAP-PCR besteht darin, daß während der Einzelstrang-Synthese bei einer niedrigen Temperatur ein 18-bp-RAP-PCR-Primer (RAP-PCR Kit, Stratagene) zufällig an jede mRNA binden und diese in cDNA revers transkribieren kann. Der erste PCR-Schritt mit dem bereits in der reversen Transkription verwendeten und einem weiteren 18-bp-RAP-PCR-Primer wird ebenfalls unter geringer Stringenz durchgeführt. Da jeder der 5 in der Transkription verwendeten Primer des RAP-PCR-Sets A mit jedem anderen der 4 übrigen Primer kombiniert werden kann, ergeben sich 20 verschiedene PCR-Kombinationen. Alle weiteren PCR-Schritte erfolgen unter hoher Stringenz, wodurch distinkte PCR-Fragmente amplifiziert werden. Die radioaktiv markierten PCR-Fragmente werden in 4%igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Differenziell exprimierte PCR-Fragmente wurden isoliert und kloniert (3.13.). Die schubspannungsabhängige Expression der RAP-PCR-Fragmente wurde in Northern-Analysen (3.22.) verifiziert. Positive Fragmente wurden zur Isolierung von homologen cDNA-Phagen einer humanen Herz-cDNA-Bank (Stratagene) genutzt (Schubert et al., 2000).

3.22. Northern-Analyse

Der Nachweis höher exprimierter mRNA-Spezies erfolgte durch Northern-Analyse (Sambrook et al., 1989). Die RNA (10 µg/Probe) wurde nach Denaturierung mit Glyoxal und Dimethylsulfoxid (DMSO) in 1,2%igen Agarosegelen aufgetrennt. Die RNA wurde mit 20 × SSC auf Hybond-N-Nylonmembranen transferiert und durch UV crosslinking fixiert. Die cDNA-Sonden wurden mit dem Oligolabelling Kit und [α -³²P]dCTP (Amersham Pharmacia Biotech) radioaktiv markiert und über MicroSpin-Säulen (Amersham Pharmacia Biotech) gereinigt. Oligonukleotide wurden mit [γ -³²P]dATP (Amersham Pharmacia Biotech) markiert. Die RNA-Membranen wurden mit der denaturierten markierten Sonde in Hybridisierungslösung (1 M NaCl, 1% SDS, 10% Dextransulfat, 100 µg/ml denaturierte Träger-DNA) bei 65°C für 16 h hybridisiert, gewaschen und bei -80°C mit Hyperfilm (Amersham Pharmacia Biotech) bzw. Kodak BIOMAX MS-Röntgenfilm exponiert. Die spezifische Sonde wurde anschließend in 0,1 × SSC, 0,1% SDS bei 80°C für 1 h dehybridisiert und die Membran mit dem Kontrollgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) (Arcari et al., 1984) rehybridisiert.

3.23. Proteinpräparation

Die Zellen wurden in PBS-Puffer isoliert und 5 min bei 3.000 rpm, 4°C sedimentiert. Das Zellpellet wurde in Lyse-Puffer (0,5% SDS in PBS) mit einer Spritze mit 23 G-Kanüle lysiert, 10 min im kochenden Wasserbad inkubiert und 10 min bei 13.000 rpm, 4°C zentrifugiert. Die Konzentration der Proteine im Überstand wurde mit dem BCA protein assay reagent (Pierce) bestimmt.

3.24. Western-Analyse

Die Proteine (10 µg/Probe) wurden auf 7,5%igen SDS-Polyacrylamidgelen mit dem Rainbow-Protein-Molekulargewichtsmarker (Amersham Pharmacia Biotech) in einer Mini-Protean II cell-Apparatur (BioRad) elektrophoretisch aufgetrennt. Der Proteintransfer auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte in einem Elektro-Blotter (BioRad) bei 15 V für 60 min. Die Nitrocellulose-Membran wurde in TTBS-Lösung (20 mM Tris-Base, pH 7,6, 137 mM NaCl, 0,1% Tween) mit 10% Trockenmilch und spezifisch verdünnten kommerziellen primären Antikörpern bzw. einem durch ein tfcD-Peptid immunisierten Kaninchenserum (Eurogentech) für 3 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Der spezifische Proteinnachweis erfolgte mit einem sekundären horseradish peroxidase-linked rabbit Ig und dem ECL Western blotting detection reagent (Amersham Pharmacia Biotech).

3.25. ELISA-Technik

Die Quantifizierung spezifischer Proteine erfolgte alternativ mit der ELISA-Technik. Die Werte wurden auf die Proteinkonzentration (BCA protein assay reagent, Pierce) normalisiert. Die endotheliale ET-1-Peptid-Freisetzung wurde mit dem Endothelin-1 ELISA system (Amersham Pharmacia Biotech), das Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT)-Protein mit dem CAT ELISA (Boehringer) und die Freisetzung der löslichen Fas-Isoform FasExo6Del mit dem soluble Fas ELISA system (Amersham Pharmacia Biotech) quantifiziert. Die apoptotische DNA-Fragmentierung wurde durch Histon-assoziierte DNA-Fragmente mit dem Cell death detection ELISA (Boehringer) nachgewiesen.

3.26. Inhibitorstudien

Durch Inhibitorstudien sollten die intrazellulären Signalwege besser verstanden werden. Nach Vorinkubation für 1 h mit dem spezifischen Inhibitor wurden die Zellen biomechanisch oder durch vasoaktive Peptide stimuliert. In jedem Experiment wurde auf eine zeitgleiche interne Kontrolle mit Inhibitor ohne Stimulus normalisiert. Es wurden als Inhibitoren der

eNOS N ω -Nitro-L-Arginin (L-NNA, bis 500 μ M, Alexis) und N ω -Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester (L-NAME, bis 500 μ M, Alexis), von Proteinkinasen H7 (10 μ M, Calbiochem), der Proteinkinase C RO-31-8220 (bis 1 μ M, Calbiochem), von Tyrosinkinasen Herbimycin A (1 μ M, Calbiochem) und der *de-novo*-Proteinsynthese Cycloheximid (35 μ M, Sigma) verwendet. Als Rezeptorantagonisten wurden für AT₁ Losartan (bis 1 μ M, Merck, Sharp & Dohme) und Candesartan (bis 100 nM, Astra), für AT₂ PD123319 (bis 1 μ M, Parke Davies), für ET_A BQ-123 (bis 1 μ M, Alexis) und für ET_B BQ-788 (bis 1 μ M, Alexis) eingesetzt.

3.27. Transfektion von Promotordeletions-Reporter-gen-Konstrukten und run-on-Assay

Eine Regulation der Genexpression auf transkriptioneller Ebene wurde durch Transfektion von Promotordeletions-Reporter-gen-Konstrukten und durch run-on-Assay analysiert. Das Egr-1-Promotordeletions-CAT-Konstrukt pEgr-1 P1.2 enthält den “full-length”-Egr-1-Promotor (von Position -957 bis +248 bp in Verhältnis zum Transkriptionsstart), der mit dem Reporter-gen Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) fusioniert ist (Gius et al., 1990). Das Konstrukt pE50 enthält den “minimal”-Egr-1-Promotor (von Position -50 bis +65 bp in Verhältnis zum Transkriptionsstart) in Fusion mit CAT (Rupprecht et al., 1993). Als Kontrollen wurden das pRSV.CAT-Plasmid (Gorman et al., 1982) für die CAT-Expression und das pRSV- β -Gal-Plasmid (Edlund et al., 1985) für die β -Galaktosidaseaktivität als Transfektionseffizienzmarker genutzt. Die Reporter-gen-Konstrukte wurden freundlicherweise von Dr. Sukhatme (Beth Israel Hospital and Harvard Medical School, Boston, MA) zur Verfügung gestellt. Die glatten Muskelzellen wurden mit dem DOTAP transfection reagent (Boehringer) transfiziert. Nach biomechanischer Stimulation wurden die Zellen lysiert, der Proteingehalt mit dem Coomassie plus protein assay reagent (Pierce), die β -Galaktosidaseaktivität mit dem β -galactosidase enzyme assay system (Promega) und das CAT-Protein mit dem CAT ELISA (Boehringer) bestimmt.

Der nuclear run-on-Assay wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Cattaruzza (Georg-August-Universität Göttingen) durch eine Technik auf RT-PCR-Basis durchgeführt (Krzesz et al., 1999).

3.28. EMSA-Technik

Der electrophoretic mobility shift assay (EMSA) dient der Quantifizierung der Transkriptionsfaktorbindungsaktivität. In Zusammenarbeit mit Dr. Wagner (Georg-August-Universität Göttingen) wurden radioaktiv markierte doppelsträngige Oligonukleotide der Bindungsstellen des Transkriptionsfaktors AP-1 mit Proteinextrakten unterschiedlich

biomechanisch stimulierter Endothelzellen inkubiert, anschließend auf Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und durch Autoradiografie nachgewiesen. Die Spezifität der Transkriptionsfaktorbindung wurde durch Kompetition mit nicht markierten Bindungsstellen nachgewiesen. Die Zusammensetzung des Transkriptionsfaktorkomplexes wurde durch spezifische Bindung von c-jun- oder c-fos-Antikörpern ("super shift") untersucht.

3.29. Quantifizierung der oxLDL-Aufnahme

Low-Density-Lipoprotein (LDL) wurde durch sequenzielle Ultrazentrifugation aus humanem Plasma isoliert, mit Cu^{2+} -Ionen zu oxLDL oxidiert (Galle and Wanner, 1998) und freundlicherweise von PD Dr. Galle (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt. Das oxLDL wurde mit 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI, Molecular Probes) markiert und zur Quantifizierung der oxLDL-Aufnahme eingesetzt (Stephan and Yurachek, 1993; Sawamura et al., 1997). HUVEC wurden 24 h in Medium mit 0,5% Serum inkubiert, mit Ang II bzw. ET-1 stimuliert und mit DiI-markierten oxLDL (100 $\mu\text{g/ml}$, 3 h) inkubiert. Das aufgenommene DiI-markierte oxLDL wird mit 2-Propanol extrahiert und die Fluoreszenz quantifiziert (520/564 nm). Die Fluoreszenzwerte wurde auf den Proteingehalt (Bio-Rad DC Protein Assay) normalisiert. Die Spezifität der Aufnahme wurde durch Kompetition mit nicht markiertem oxLDL nachgewiesen.

3.30. Nachweis von Superoxidanionen durch Chemilumineszenz

Ein Nachweis von Superoxidanionen erfolgte in Zusammenarbeit mit PD Dr. Brömme (Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung der Martin-Luther-Universität) durch Lucigenin- bzw. Coelenterazin (10 μM , Molecular Probes)-vermittelte Chemilumineszenz (Duerrschmidt et al., 2000). Die Sensitivität beider Fluorochrome wurde durch Xanthinoxidase/Xanthin (XO/X)-generierte Superoxidanionbildung verglichen. Die Chemilumineszenz wurde in einem Lumat LB 9501-Chemiluminometer (EG & Berthold, Wildbad) bestimmt. Die Spezifität der Reaktion wurde durch Superoxid-Dismutase (SOD, 40 $\mu\text{g/ml}$) und den Flavinenzym-Inhibitor Diphenyliodoniumchlorid (bis 500 μM , ICN) untersucht. Die Messungen in HUVEC erfolgte in Pyrex-Röhrchen (Dunn). Die durch HUVEC generierte Chemilumineszenz wurde auf den Proteingehalt normalisiert und in relative light units (rLU) pro min und pro μg Protein angegeben.

3.31. Cytochrom c-Assay

Der Cytochrom c-Assay wurde zur Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) eingesetzt. Er beruht auf der Reduktion des Cytochrom c ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$) durch O_2^- . Die reduzierte Cytochrom c-Form als Maß der Superoxidanionbildung kann durch ein Absorptionsmaximum bei 550 nm spektrophotometrisch nachgewiesen werden. Zur Messung der O_2^- -Bildung wurden Granulocyten und HUVEC in 3 ml Assay-Puffer (M 199 mit Earle's Salzen, L-Glutamin, ohne Phenolrot, Life Technologies, und Cytochrom c, 40 μM , Sigma) inkubiert. Dem Assay-Puffer wurde 500 μM L-NAME zugesetzt, um die eNOS als O_2^- -Quelle auszuschließen. Ein Teil der Proben wurde mit dem Flavinenzym-Inhibitor Diphenyleniodoniumchlorid (DPI, 100 μM , Sigma) inkubiert, um die DPI-inhibierbare O_2^- -Bildung als Maß für die NADPH-Oxidase-Aktivität zu bestimmen. Nach Stimulation der Kulturen mit oxLDL (1 bis 3 h) bzw. Ang II (4 h) wurden je 300 μl der Überstände bei 550 nm gemessen. In allen Versuchen wurde ein Leerwert eingeschlossen, um zellunabhängige Absorptionsänderungen des Assay-Puffers auszuschließen. Die NAD(P)H-Oxidase-Aktivität wurde auf den Proteingehalt (BCA protein assay reagent, Pierce) normalisiert.

3.32. Immunfluoreszenz

Endothelzellen wurden in 3,7%iger Formalinlösung in PBS-Puffer fixiert und mit 0,5% Triton X-100, 0,2% Tween 20 in PBS permeabilisiert. Glatte Muskelzellen wurden in 4%iger Paraformaldehydlösung in PBS bei Raumtemperatur und Methanol bei -20°C fixiert. Die fixierten Zellen wurden anschließend in 0,1% bzw. 1% BSA in PBS mit spezifisch verdünnten primären Antikörpern für 1 h inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und mit Fluorescein-Isocyanat-, Cy3- oder Cy5-gekoppelten sekundären Antikörper für 45 min inkubiert. In einem Teil der Zellen wurden die Zellkerne in den letzten 5 min der Inkubation durch Zugabe von DAPI gefärbt. Die Zellen wurden eingebettet und mit einem Nikon Eclipse E600-Fluoreszenz-Mikroskop und Kodak Tmax 100 ASA-Film fotografiert.

3.33. Statistik

Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben ($n \geq 3$ in jedem Experiment). Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Student's t-test bzw. der ANOVA-Methode mit Bonferroni t-test bei multiplen Vergleichen (SigmaStat statistical software, Jandel Corp.). Ein Wert von $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1. Biomechanische Regulation der Genexpression in Gefäßzellen

Die Regulation der Genexpression durch biomechanische Kräfte wurde durch Applikation von Schubspannung auf Endothelzellen und von Dehnung auf glatte Muskelzellen untersucht. In einem ersten Ansatz wurden Gene gesucht, die durch arterielle oder venöse Schubspannung in Endothelzellen differenziell reguliert werden. In weitergehenden Analysen wurde die schubspannungsabhängige Regulation von Genen des Endothelin-Systems, von pro- bzw. antiapoptotischen Genen sowie von Transkriptions-faktoren in Endothelzellen untersucht. Darüber hinaus wurde die Regulation von Transkriptionsfaktoren durch mechanische Dehnung in glatten Muskelzellen analysiert.

4.1.1. Klonierung eines durch arterielle bzw. venöse Schubspannung differenziell regulierten Gens

Humane Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC) wurden in einem Plattenkegel-Viskosimeter für 24 h venösen (1 dyn/cm^2) oder arteriellen (15 dyn/cm^2) Schubspannungswerten ausgesetzt. Nach anschließender RNA-Isolation, reverser Transkription und RAP-PCR konnten insgesamt 30 cDNA-Fragmente identifiziert werden, die durch venöse bzw. arterielle Schubspannung differenziell reguliert werden (Abb. 8).

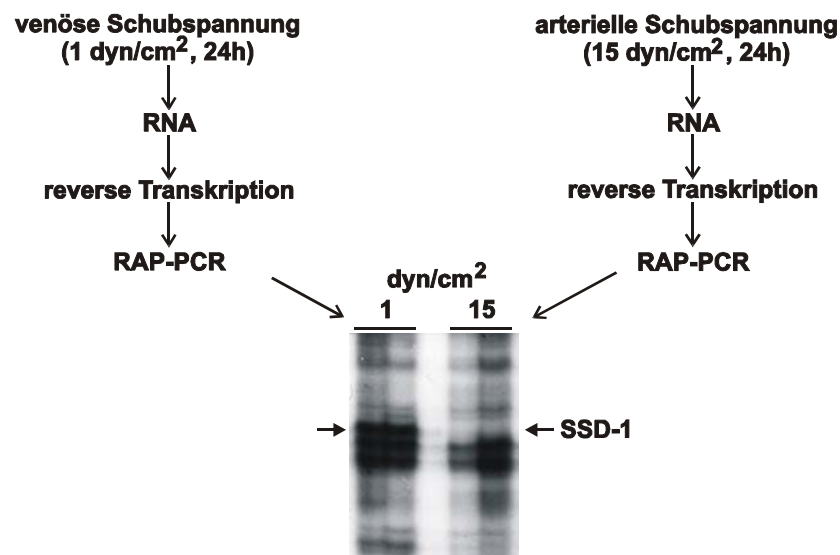


Abb. 8: Identifizierung von Genen, die durch chronische venöse bzw. arterielle Schubspannung differenziell in humanen Endothelzellen (HUVEC) exprimiert werden. HUVEC wurden für 24 h laminarer Schubspannung von 1 dyn/cm^2 (venös) oder 15 dyn/cm^2 (arteriell) ausgesetzt. Die RNA wurde isoliert und revers transkribiert. Durch RAP-PCR wurde ein Gen identifiziert, das differenziell durch arterielle Schubspannung herabreguliert wird (SSD-1: shear stress downregulated gene-1).

Von diesen differenziell exprimierten cDNA-Spezies wurde das RAP-PCR-Fragment ausgewählt, das die stärkste Herabregulation durch arterielle Schubspannung zeigte. Diese mRNA-Spezies wurde “shear stress downregulated gene-1” (SSD-1) genannt. SSD-1-RAP-PCR-Fragmente wurden anschließend in den pCR-Script Amp SK(+)-Vektor kloniert, und rekombinante SSD-1-Plasmide durch Northern-Analysen mit HUVEC-RNA nach Applikation venöser oder arterieller Schubspannung verifiziert. Mit diesen SSD-1-cDNA-Fragmenten wurden 3 unabhängige, überlappende cDNA-Klone aus einer menschlichen Herz-Lambda ZAP II-cDNA-Bank isoliert. Ein cDNA-Fragment, das in allen 3 SSD-1-cDNA-Klonen enthalten ist, wurde anschließend in Northern-Analysen mit RNA aus HUVEC nach Applikation arterieller Schubspannung hybridisiert (Abb. 9).

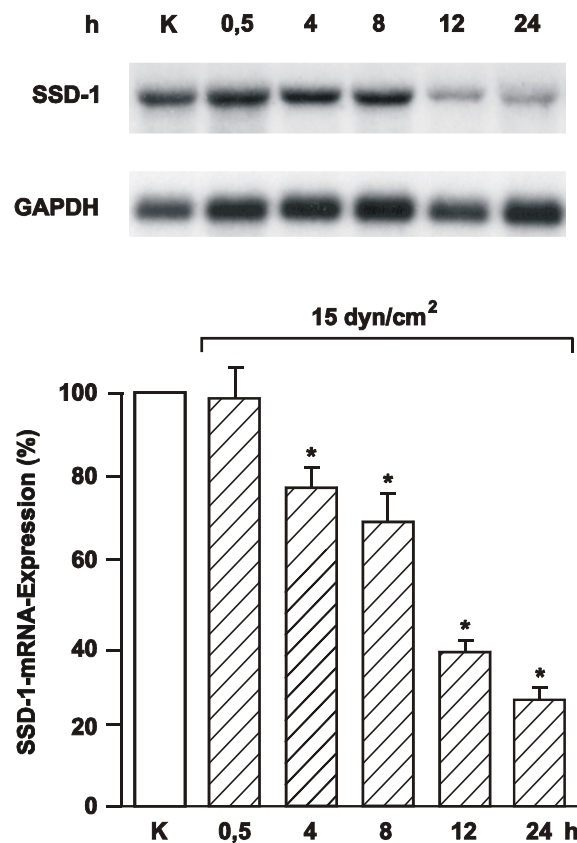


Abb. 9: Zeitabhängige Herabregulation der “shear stress downregulated gene-1” (SSD-1)-mRNA-Expression durch arterielle Schubspannung in humanen Endothelzellen (HUVEC). HUVEC wurden für unterschiedliche Zeiten laminarer arterieller Schubspannung (15 dyn/cm²) ausgesetzt. Die isolierte RNA wurde mit einem SSD-1-cDNA-Fragment in Northern-Analysen hybridisiert. Die SSD-1-mRNA-Expression wurde auf die GAPDH-Expression normalisiert. Angaben in Prozent der Kontrolle (K) ohne Schubspannung, n=4, *P<0,05 zu Kontrolle. Stationäre Kontrolle: offener Balken, Schubspannung: schraffierte Balken.

Das SSD-1-cDNA-Fragment hybridisiert mit einem Transkript von 4,1 kb in HUVEC-RNA. Nach Applikation arterieller Schubspannung auf HUVEC von mehr als 4 h kommt es zu einer zeitabhängigen Herabregulation der SSD-1-mRNA, die ihr Maximum nach 24 h mit einer Expression von 30% des stationären Kontrollniveaus erreicht. Im Gegensatz dazu hat Applikation von venöser laminarer Schubspannung (1 dyn/cm²) keinen Effekt auf die SSD-1-mRNA-Expression in HUVEC. In unabhängigen Experimenten wurden weitere RAP-PCR-Fragmente mit Homologie zu SSD-1 isoliert, die eine identische Herabregulation durch arterielle Schubspannung im Vergleich zu stationärer Kontrolle oder venöser Schubspannung zeigen.

4.1.2. Molekulare Charakterisierung und schubspannungsabhängige Expression des humanen β -tubulin folding cofactor D-Gens

Die klonierte SSD-1-cDNA wurde molekular charakterisiert und seine schubspannungsabhängige Expression detaillierter untersucht (Schubert et al., 2000). Die DNA-Sequenzen der 3 SSD-1-cDNA-Klone überlappen in großen Sequenzbereichen. Die 3 cDNA-Sequenzen der mit random- und oligo-dT-Primern angelegten cDNA-Bank wurden daher kombiniert. Die resultierende SSD-1-cDNA-Sequenz hat eine Länge von 4049 bp. Sie enthält einen "open reading frame" von 3744 bp, der ein Protein von 1248 Aminosäuren (AS) kodiert. Die SSD-1-Aminosäuresequenz enthält 2 potenzielle Zelladhäsionssequenzen (Arg-Gly-Asp- oder RGD-Motive). Von den 9 potenziellen N-Myristoylierungsstellen hat wahrscheinlich nur eine N-terminale Stelle *in vivo* eine Bedeutung. Das SSD-1-Protein enthält potenzielle Phosphorylierungsstellen für die cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinase (1 Stelle), Tyrosinkinase (1 Stelle), Proteinkinase C (8 Stellen) und Caseinkinase II (22 Stellen) (Abb. 10).

Die SSD-1-Aminosäuresequenz zeigt 80,4% Identität und 90,9% Homologie zur Sequenz des β -tubulin folding cofactor D (tfcD)-Gens des Rindes (Tian et al., 1996). Das tfcD-Gen ist funktionell in die Faltung des neu synthetisierten β -Tubulins in seine native Konformation involviert.

Die humane SSD-1/tfcD-cDNA wurde mit RNA unterschiedlicher menschlicher Gewebe in Northern-Analysen hybridisiert. Dabei wurden tfcD-mRNA-Spezies von 4,6, 4,1 und 2,8 kb identifiziert. Das tfcD-Transkript von 4,1 kb, das auch in Endothelzellen exprimiert wird, konnte in allen bisher getesteten humanen Geweben (Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere und Pankreas) nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden 2 gerin-

GAATTCACG TGAGGCGGGG GCGCGGTCCC CAGGTCGCCG AGATGGCCCT GAGCGACGAA CCGCGCGGG	70	ACAGGCGCCCT CACGGACCAT CTGGACGAGC AGGCACTGCA GGGCCTGAAG CAGATTCCAC AGCAGCTCTA	2030
M A L S D E F A A	9	N R F V T D H L D E Q A V Q G L K Q I H Q Q C L Y	663
GCGGCCCGA GGAGGAGCGG GAGGACAGA CACTGGCCTT TGCGCGCGCG CTGGAAGCGT TCAGGAGAG	140	TGATCGTCAG TTATACAGGG GTCTGGGAGG ACAGCTCATG AGACAGCAGC TGTGTGTGTT AATAGAAAG	2100
G G P E E E A E D E T L A F G A A L E A F S E S	33	D R Q L Y R G L G G Q L M R Q A V C V L I E K	686
CGCGGAGACC CGGCGCTGC TGCGCGCCTT GCGGAGGTG CACGCGCGCG GCGCGGAGCG CGAGGTGGCC	210	TTGTCACTT CCAAAATGCC CTTTAGAGT GACACCGTAA TTGATGTTG GCAATGGCTG ATAAATGACA	2170
A E T R A L L G R L R E V H G G G A E R E V A	56	L S L S K M P F <u>R G D</u> T V I D G W Q W L I N D	709
CTGGAGCGCT TCOCCTGAAT AATGACAAA TACCAGAGCG AGCCTCATCT GTTGGACCGC CACCTTGAAT	280	CTTTAGACA TCTCCATCT ATCTCAAGT ACTCCCGCCA CGAGATGAG GATGACGAG TCTCGCGCT	2240
L E R F R V I M D K Y Q E Q P H L L D P H L E	79	T L R H L H L I S S H S R Q Q M K D A A V S A L	733
GGATGATGAA CTGTGTTG GACATAGTG AAGATCAGC ATCTCCAGCT TCCTGTGAC ATCTGGCTTT	350	GGCTGCTCTA TGCACTGAAT ATTACATGAA GGAGCCGGG GAGGCGATC CGCAATTCA GGAGGAGCTG	2310
W M M N L L L D I V Q D Q T S P A S L V H L A F	103	A A L C S E Y Y M K E P G E A D P A I Q E E L	756
TAAATTTCTT TACATCATCA CCAAGSTTGG AGGCTAATA ACAITTTCTT GTTATTTC TCATGAAGTT	420	ATCACGCACT ACGTGCTGA GCTTGGAA CCGAGGAGA TGACTGCTG TGCTTCTCTC TTGCGCTTGG	2380
K F L Y I I T K V R G Y K T F L R L F P H E V	126	I T Q Y L A E L R N P E E M T R C G F S L A L	779
GCGGATGAG AGCCTGTTTT AGATTGGTC ACAATTAGA ATCCCAAGA CCATGAAGCT TGGGAACCC	490	GCGCCCTTC AGCCTTCCTT CTGAAAGGCC GGCTCCAGCA GTTCTCACA GTTTAGGAG CCCTTACCCA	2450
A D V E P V L D L V T I Q N P K D H E A W E T	149	<u>G A L L P G F L</u> L K G R L Q Q V L T G L G A L T H	803
GCTACATCT TTTGCTCGG CTCTCCGTA CCGCTGAT CCGTTTGT TTTCTCGC TTGAGCGGAA	560	CACCTCCCC GAGGACGTAA TTTTGTCTA GTCCAGAGA GACGCTTGA AGGCCATTGC GAGGATTTC	2520
R Y M L L L W L G S V T C L I P F D F S R L D G N	173	T S P E D V S F A E S R R D G L K A I A R I C	826
CCTCTCACC CAGCCTGGC AAGCAGATG GTCCATAATG GACCTATTC TCACAAATAG AGATCTCTAC	630	CAGACTGTG GTGTGAAGC AGGAGCCCA GACGAAGCTG TGTGCGAGA GAATGTTCCT CAGATTACT	2590
<u>L L T Q P G Q A R M S I M D R I L Q I A E S Y</u>	196	Q T V G V K A G A P D E A V C G E N V S Q I Y	849
TTGATTGCA GTGACAGGC CGAGATGCA GCTGCTGCTC ATTTATCACA CGCTGTGATG	700	GTGCGTCTG GGCCTCATG GACACTACA CCACGGACAG CAGAGGGGAC GTGGGCACCT GGGTCCGCAA	2660
L I V S D K A R D A A A V L V S R F I T R P D	219	C A L L G C M D D Y T T D S <u>R G D</u> V G T W V R K	873
TCAAGCAAG CAAGATGGCT GAGTTCCTG ACGTAATCTG GCGCCTCTCT CCTTCAGAC	770	GCGCGCATG ACCACTCTGA TGATCTGAC ACTTCTCTG GCTCGAGCC ASCCTGAGCT GATGAGGCC	2730
V K Q S K M A E F L R D W S L C N L A R S S F Q T	243	A A M T S L M D L T L L L A R S P F E I E A	896
CATGCGAGG GTCATCACCA TGATGGGAG GCTCGAGGCC CTGGACAAA TATTTAACA TGGAAACCT	840	CATACCTCT GTGCTCATAT GTGCTGTGTG GCGCCAGAG CCAGTGAAGA GATTGACCTG TTCCGCTCTC	2800
M Q G V I T M D G T L Q A L A Q I F K H G K R	266	H T C E R I M C C V A Q Q A S E K I D R F R A	919
GAAGACTGT TGCCCTATGC TGCCACTCTG CTCAGTGGC TGATGTGCTG CAGACTCCTC GAGAGCAACC	910	ACGCGCCAG CGTGTCTCTG ACGCTCTGCT ACTTTGACAG CCCTCCCATC CCCACGTCG CCCACGAGG	2870
.R.P.C...P.Y A A T V L R C L D G C R L P E S N	289	H A A S V F L T L L H F D S P P I P H V P H R G	943
AGACCTCTCT CGGAGAGCTG GCGCTGAAGC TTGTGACAGC ACTGGGCTG ACATTCTCTA AGCGAGAGT	980	AGACTGGAA AGCTGTTTC CCAGTCCGA TGTGGCTCTC GTGAAGCTGA GTGCACCTTC CAGGCTCTC	2940
Q T L L R K L G V K L V Q R L G L T F L K P K V	313	E L E K L F P R S D V A S V N W S A P S Q A F	966
GGCAGCATGG AGGTACGAGC GTGCTGCCG ATCTTTGCTG GCAATCTGC AGCTCCTAC TCAGGCTCAG	1050	CCAGCATCA CCAGCTCTT TGGCTGCC ACCTACGCT ACCAGCTCT CTTGAGGCTA GTGCTCTCCC	3010
A A W R Y L G L P T E D D D E D D V F P E G V E	336	P R I T Q L L G L P T Y R Y L H L L R L V S	989
AGTGAGCAGA AGCCTCATCT CCGTACGAA GATGACAGC AAGATGAGA CGTCCAGAG GGGGTGGAGC	1120	TGGCGCGCT GAGGAGTGC ACGATCCGC ACTCCACCA GAGCTCTTT GAGTACATGA AGGCATTCA	3080
S E Q K P L I L T E D D D E D D V F P E G V E	359	<u>L G G L T E S T</u> I R H S T Q S L F E Y M K G I Q	1013
GTGTATAGA CACGCTGCTG CTGCGGCTGA AGGACAGGA CACGCTGCTG CGTGTGCTG CAGCAGAGG	1190	S D P Q A L G S F S <u>G T L L Q I F E D N L L N</u>	1036
R V I E Q L L V G L K D K D T V V R W S A A K G	383	GAGAGGGTG CGTGCGCTG GCTGAAGAG CTGGACACG TGCTCACCA CGGCTGCTC GACATCTCA	3220
CATCGGTAG ATGGCTGGCA GCGTCCGAG AGCCTGGCCG GATGATGTC TCGGCTCTG GCTGACTGC	1260	E R V S V F L L K T L D H V L T H G C F D I F	1059
I G R M A G R L P R A L A D D V V G S V L D C	406	CCAGCGAGG GAGCAGCCC TTTGCTGTA AGTTGCTTC GCTCGTGAAG AAAGAATCA AGAATTCAA	3290
TTCACTTCT AGGAGACTGA CAAGCGTGW CATGGCGCT GTCTGGCGCT GGCAGAGCTG GCGAGGAG	1330	T T E E D H P F A V K L L A L V K K E I K N S K	1083
F S F Q E T D K H G G C L A L A E L G R R	429	AGATATCCAG AAGCTCTCT CAGGATCGC AGTTGACTT CCAAGTCGA CACTGCTGT TGTAGGACA	3360
GCTGTGCT GCCTCTCGA CTGCTGGAT TTGTGCGCT GATCCTGAAG CGCTGACCT ACGACGAGAA	1400	D I Q K L L S G I A V D F P S A T L V C V G T	1106
G L L L P S R L V D V V A V I L K A L T Y D E K	453	GTGAGATGT AGCAGACAC ACACCTCCG GTTGGGCGC CAGGCGCGA CTGCTCTCT GATCTCTA	3430
CGGCGCTGC TGCGAGCTGG GCACACAGT CAGGAGCGC GCCTGCTAG TGTGCTGGC CTGCGCGCT	1470	V Q M Y A H T H L R L G A P G P H C A H G S A	1129
R G A C S V G T N V R D A A C Y V C W A F A R	476	TGCGAGGTT CTGCGGATG GTGAGTTCC CCGCGAGCT GAGGAGCAG GCGCTCTGT AGCTGTGCT	3500
GCTATGAGC CTCAGAGCTG GAAGCCTTT GTGACTGCAA TCTGAGTGC ACTGTGATT GCTGCGGTG	1540	M P R F C G M V Q F P G D V R R Q A L L Q C L L	1153
A Y E P Q I E L K P F V T A I S S A L V I A A V	499	GCTCTCTGC CACCGTTCC CGTGTATCG GAAGACAGC GCGAGCCAGG TGTACGAGC ATTGCTACC	3570
TTGACGAGA CATAACTGC AGAAGACGAG CCGTCCGCG CTTCAGGAG AATGTGGGA GACAGGGCAC	1610	L L C H R F P L I <u>R K T F</u> A S Q V Y E T L L T	1176
F D R D I N C R R A A S A A F Q E N V G R Q G T	523	TACAGTACG TGCTGGGCG GGTGTGCTG GAGGAGTGG TGACTGTGCT CAGTGACACT GCGTGGGAG	3640
TTTCCCTCAT GGTATTGATA TTTTGACAC AGCTGACTAT TTGCGCGCTG GTAACAGATC CAACGTATTC	1680	Y S D V V G A D V L D E V V T V L S D T A W D	1199
F P H G I D I L T T A D Y F A V G N R S N C F	546	CGGAGCTGC AGTGTGAGA GAGCAGCGA ACCGTCTGTG TGACCTCTG GCGCTACCA GCGCCAGCTG	3710
CTGGTTATA GTGTGTTT TGCGCGCTT CCGTGAATCA CGCAGCAAT GATAGACAC CTGTTACCA	1750	A E L A V V R E Q R N R L C D L L G V P S P T W	1223
L V I S V F I A G F P E Y T Q P M I D H L V T	569	GTGCGAGCT TGCTGCTGC TGAAGCAGT CCGTGGGCC ATACCTCAC CCGCTCTGT GAGGATGCT	3780
TGAAGATGAC CCATGCGAT GGGGTATCC GAGAGTTGC TGCGAGGCG CTGACACAC TGCGCCAGCA	1820	C P A W C L L K P V L E P I P H P C L V R M S	1246
M K I S H W D G V I R E L A A R A L H N L A Q Q	593	TGTCTCTGAG GGAGCGCGT GTGAAAGCC TCGACAGTG GTGCTCCAG CTGTTGAAG GTAGCGCTGG	3850
GGCAGCCGAG TTCAGGCCA CCGAGTCTT CCGGAGGCTG CTGTCATGA CACTGAGTCC AGATCTTAC	1890	C S	1248
A P E F S A T Q V F P R L L S M T L S P D L H	616	CCCTGGAGG CTGGCACTAG CTGACAGCTT TTCTCTCTG CACTGCGCT CTGTTGACTT GGGTGGAGC	3920
ATGAGGCATG GGTGATTCT CGCTGCGCA GAAGTGTCT ACGCTTGTG CAAACTGCA GCCCAAGAGA	1960	CTCTGCGCT CACTGACA CAAATGTCT TCTATATA TCAATGACA AGAAAAAA AAAAAAAA	3990
M R H <u>G S I L A C A</u> E V A Y A L Y K L A Q E	639	AAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA	4049

Abb. 10: “Shear stress downregulated gene-1” (SSD-1)-cDNA- und abgeleitete Aminosäuresequenz, die für das humane Homolog des β -tubulin folding cofactor D (tfcD) kodiert. Die Zahlen rechts neben der Sequenz symbolisieren die Positionen der Nukleotide bzw. Aminosäuren. Die Positionen potenzieller Zelladhäsionsstellen (RGD-Stellen), N-Myristoylierungsstellen und Phosphorylierungsstellen der cAMP- und cGMP-abhängigen Proteinkinase und der Tyrosinkinase sind angegeben. Die Sequenz ist in der EMBL/GenBank-Datenbank (Accession No. AJ006417) gespeichert.

ger exprimierte tfcD-mRNA-Spezies von 4,6 und 2,8 kb im Gehirn (nur 4,6 kb), Plazenta, Lunge und Skelettmuskel (nur 2,8 kb) sowie im Pankreas detektiert.

In weitergehenden Experimenten wurde die schubspannungsabhängige Expression des tfcD-Gens in HUVEC untersucht. Nach Applikation von laminarer Schubspannung für 24 h wurde bei Werten von mehr als 5 dyn/cm^2 eine dosisabhängige Herabregulation der tfcD-mRNA-Expression gefunden (Abb. 11).

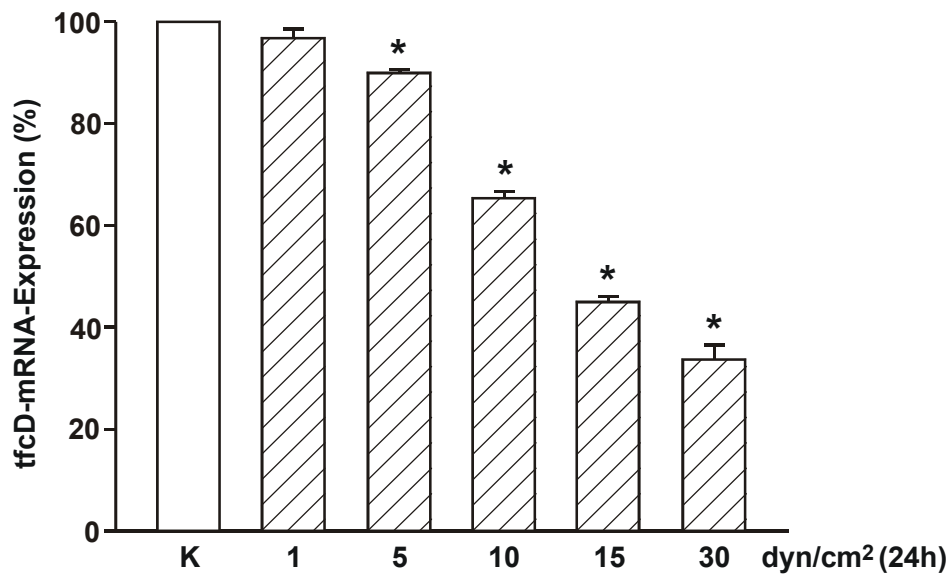


Abb. 11: Dosisabhängige Herabregulation der humanen β -tubulin folding cofactor D (tfcD)-mRNA-Expression durch chronische laminare Schubspannung. HUVEC wurden für 24 h unterschiedlicher laminarer Schubspannung ausgesetzt und die RNA isoliert. Die Quantifizierung der tfcD-mRNA-Expression erfolgte durch auf 18S-rRNA-normalisierte “real time”-PCR in Prozent der jeweiligen internen Kontrolle (K) ohne Schubspannung ($n \geq 3$, $*P < 0,05$ zu Kontrolle). Stationäre Kontrolle: offener Balken, Schubspannung: schraffierte Balken.

Die schubspannungsabhängige Herabregulation der tfcD-mRNA könnte durch eine Herabregulation der Transkription oder durch einen verstärkten mRNA-Abbau verursacht sein. Daher wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Cattaruzza (Georg-August-Universität Göttingen) “nuclear run-on-Assays” auf RT-PCR-Basis mit Kernen aus HUVEC mit bzw. ohne Applikation von arterieller laminarer Schubspannung durchgeführt. Dabei konnte eine Herabregulation der tfcD-mRNA (auf $11 \pm 7\%$ der stationären Kontrolle, $n=3$, $P < 0,05$) durch arterielle Schubspannung auf transkriptioneller Ebene nachgewiesen werden. Als positive Kontrolle wurde in den gleichen Kernen die von zahlreichen Laboren beschriebene Induktion der endothelialen NO-Synthase (eNOS) durch Schubspannung auf transkriptioneller Ebene (auf $273 \pm 61\%$ der stationären Kontrolle, $n=3$, $P < 0,05$) nachgewiesen. Die GAPDH-mRNA wurde dabei durch Schubspannung nicht beeinflusst.

Da arterielle Schubspannung die eNOS-Expression in Endothelzellen erhöht, wurde der Einfluß einer pharmakologischen Hemmung der eNOS (L-NAME, 400 μ M) auf die tfcD-Expression untersucht. Der eNOS-Inhibitor hatte keinen Einfluß auf die basale tfcD-mRNA-Expression, blockierte jedoch die schubspannungsabhängige Herabregulation der tfcD-mRNA (Abb. 12A).

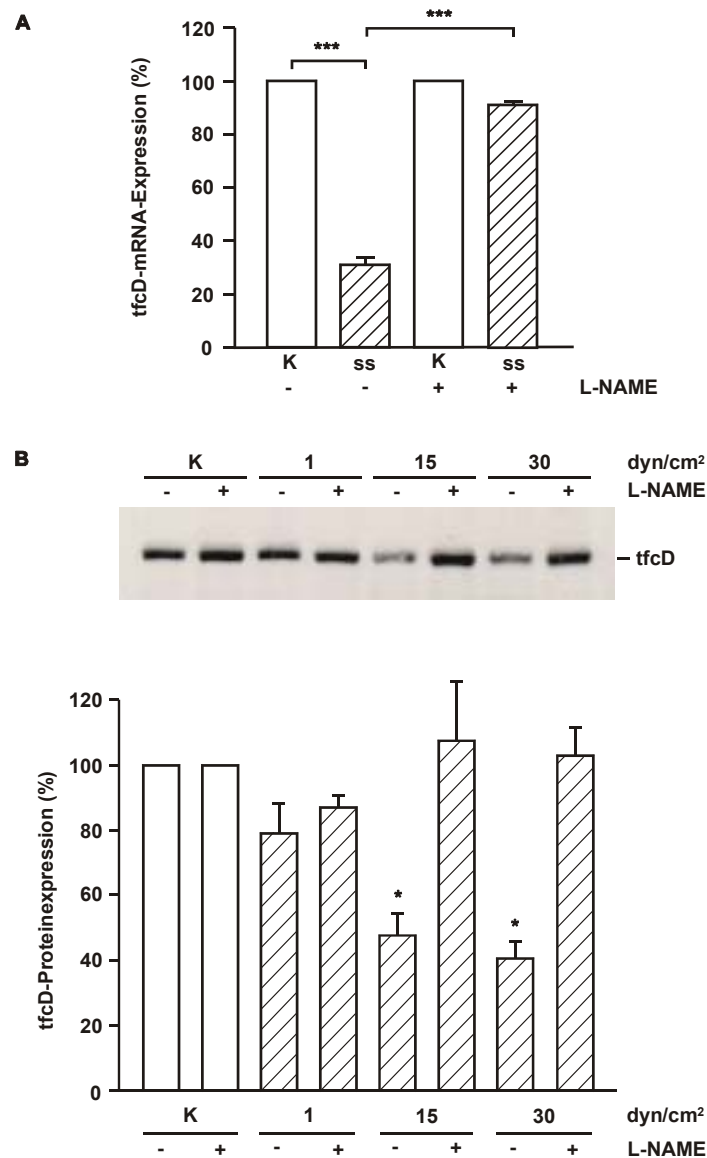


Abb. 12: NO-abhängige Herabregulation der β -tubulin folding cofactor D (tfcD)-mRNA- und Proteinexpression durch chronische arterielle laminare Schubspannung. HUVEC wurden für 24 h laminarer Schubspannung ohne bzw. mit Hemmung der eNOS (L-NAME, 400 μ M) ausgesetzt und RNA (A) oder Protein (B) isoliert. In A wurde arterielle Schubspannung (ss) von 15 dyn/cm² appliziert. Die Quantifizierung der tfcD-mRNA-Expression erfolgte durch Northern-Analyse (A) und der tfcD-Proteinexpression durch Western-Analyse (B) in Prozent der jeweiligen internen Kontrolle (K) ohne Schubspannung ohne bzw. mit L-NAME ($n \geq 3$, * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ zu Kontrolle). Stationäre Kontrolle: offene Balken, Schubspannung: schraffierte Balken.

Die NO-abhängige Herabregulation des tfcD-Gens sollte auf Proteinebene verifiziert werden. Durch Immunisierung von Kaninchen mit einem tfcD-Peptid wurde ein polyklonaler tfcD-Antikörper generiert (Eurogentech, Berlin). Mit Hilfe dieses Antikörpers konnte eine analoge Herabregulation des tfcD-Proteins durch arterielle laminare Schubspannung nachwiesen werden, die NO-abhängig ist (Abb. 12B).

Eine direkte Herabregulation der *tfcD*-mRNA durch NO wurde durch Inkubation von HUVEC mit dem NO-Donor DETA-NO getestet. Bei DETA-NO-Konzentrationen von ≥ 1 mM war eine 30%ige Herabregulation der *tfcD*-mRNA nachweisbar.

Die intrazelluläre Verteilung des *tfcD*-Proteins wurde mit Hilfe des *tfcD*-Antikörpers in HUVEC untersucht. Das *tfcD*-Protein konnte im Kern und in filamentösen Strukturen im Zytoplasma nachgewiesen werden. Ein ähnliches Proteinverteilungsmuster wurde mit einem β -Tubulin-Antikörper in den gleichen Zellen beobachtet. Nach Applikation von arterieller Schubspannung konnten außer einer in Richtung der wirkenden Schubspannung erfolgten Ausrichtung und Elongation der Endothelzellen keine weiteren spezifischen Veränderungen im Verteilungsmuster des *tfcD*-Proteins nachgewiesen werden (Abb. 13).

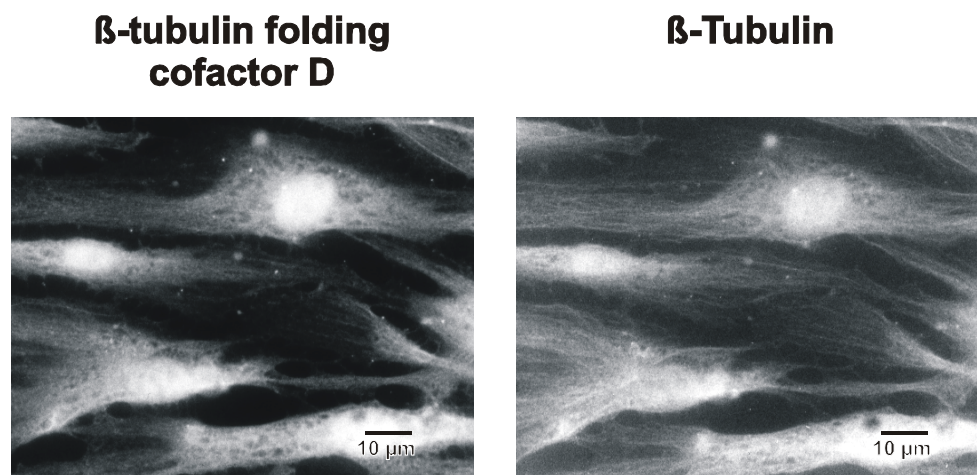


Abb. 13: Intrazelluläre Lokalisation des β -tubulin folding cofactor D (*tfcD*)-Proteins in Endothelzellen. HUVEC wurden fixiert, permeabilisiert und die Verteilung des *tfcD*- und des β -Tubulin-Proteins durch Immunfluoreszenz-Technik (Nikon Eclipse E600-Fluoreszenz-Mikroskop) untersucht.

Damit konnte mit dem β -tubulin folding cofactor D ein neues Gen identifiziert werden, das NO-abhängig durch arterielle laminare Schubspannung in Endothelzellen herabreguliert wird.

4.1.3. Effekt von Schubspannung auf die Expression weiterer β -tubulin folding cofactor-Gene

Da die physiologische Funktion des β -tubulin folding cofactor D in der Regulation der Faltung des Mikrotubuli-Proteins β -Tubulin liegt, wurden Methoden zur Quantifizierung der mRNA-Expression weiterer humaner β -Tubulinfaltungsfaktoren entwickelt. In Rinderzellen steht *tfcD* im Gleichgewicht mit dem β -tubulin folding cofactor A (*tfcA*). Da das menschliche *tfcA*-Gen bisher nicht bekannt ist, wurde zunächst das humane Homolog des *tfcA*-Gens durch

RT-PCR mit homologen Primern und anschließender 5' RACE-Technik kloniert. Die humane *tfcA*-cDNA hat eine Länge von 347 bp und kodiert für ein Protein von 108 Aminosäuren. Die Aminosäuresequenz des humanen β -tubulin-folding cofactor A zeigt 92 bzw. 91% Identität, sowie 96 bzw. 93% Homologie zu den verwandten Proteinen aus Maus bzw. Rind.

In weitergehenden Analysen wurde die Regulation der *tfcA*-, *tfcE*- und β -Tubulin-mRNA-Expression durch arterielle Schubspannung in HUVEC untersucht (Abb. 14).

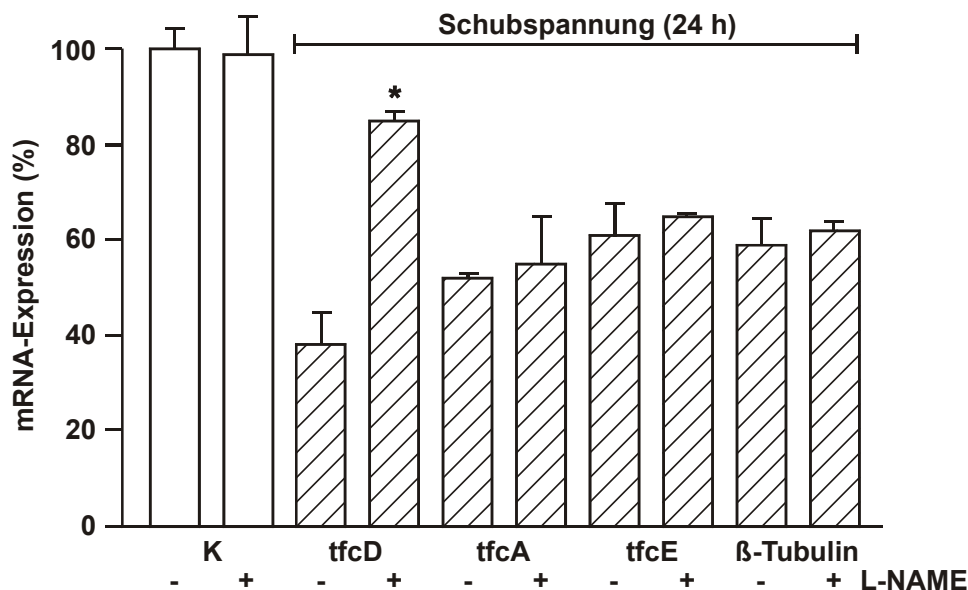


Abb. 14: Herabregulation der β -tubulin folding cofactor A (*tfcA*)-, *tfcE*- und β -Tubulin-mRNA-Expression auf einem NO-unabhängigen Signalweg durch chronische arterielle laminare Schubspannung. HUVEC wurden für 24 h arterieller laminarer Schubspannung ohne bzw. mit Hemmung der eNOS (L-NAME, 400 μ M) ausgesetzt und die RNA isoliert. Die Quantifizierung der mRNA-Expression erfolgte durch semi-quantitative RT-PCR in Prozent der jeweiligen internen Kontrolle (K) ohne Schubspannung ohne bzw. mit L-NAME ($n \geq 3$, * $P < 0,05$ zu Kontrolle). Stationäre Kontrolle: offene Balken, Schubspannung: schraffierte Balken.

Die *tfcA*-, *tfcE*- und β -Tubulin-mRNAs werden durch chronische arterielle Schubspannung auf 60% der Expression der stationären Kontrolle herabreguliert. Die schubspannungsabhängige Herabregulation dieser Gene erfolgt im Gegensatz zu *tfcD* auf einem NO-unabhängigen Signalweg.

4.1.4. Regulation des Endothelin-Systems durch Schubspannung in Endothelzellen

Die Regulation der Expression von Genen des Endothelin-Systems (Pre-Pro-Endothelin-1, PPET-1; Endothelin-converting enzyme-1, ECE-1, bzw. Endothelin-Rezeptor B, ET_B) sowie der ET-1-Freisetzung durch laminare Schubspannung wurde in humanen Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC) untersucht (Morawietz et al., 2000b).

Eine Applikation von arterieller Schubspannung (30 dyn/cm²) auf HUVEC führt zu einer transienten Induktion der PPET-1-mRNA auf das 1,7-fache nach 30 min. Nach chronischer Applikation arterieller Schubspannung (24 h) kommt es jedoch zu einer Herabregulation der PPET-1-mRNA-Expression. Diese ist dosisabhängig und konnte durch Northern-Analysen und kompetitive RT-PCR nachgewiesen werden (Abb. 15).

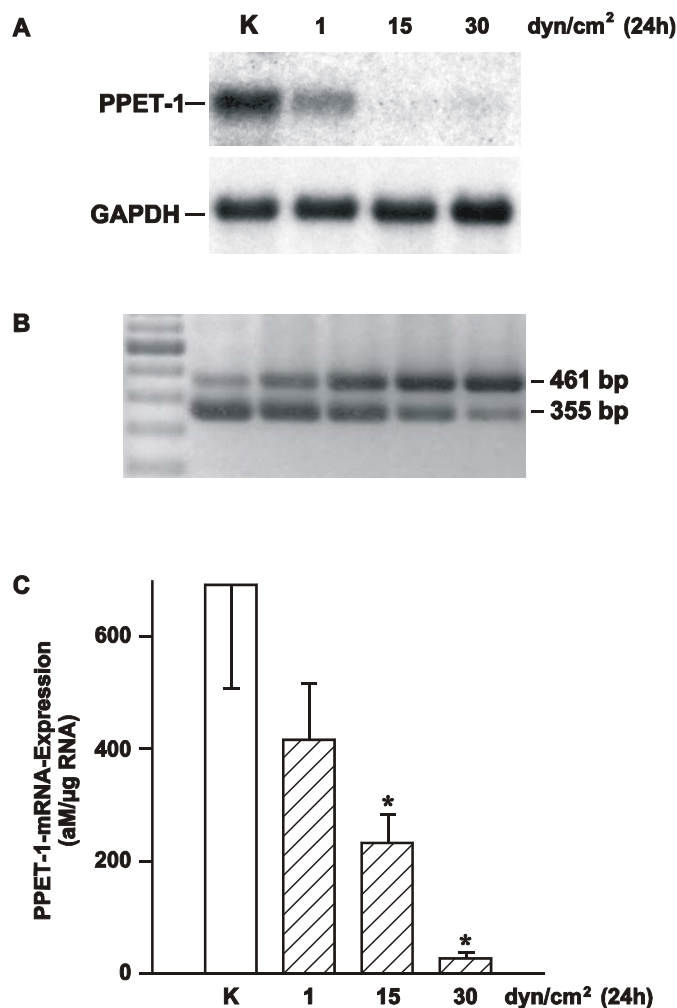


Abb. 15: Dosisabhängige Herabregulation der Pre-Pro-Endothelin-1 (PPET-1)-mRNA-Expression durch laminare Schubspannung (24 h) in HUVEC. Die Quantifizierung der PPET-1-mRNA erfolgte durch Northern-Analyse mit nachfolgender GAPDH-Hybridisierung (A) oder durch kompetitive RT-PCR mit einem intern verkürzten Standard von 355 bp (B, C). C: n=5, *P<0,05 zu Kontrolle (K). Stationäre Kontrolle: offener Balken, Schubspannung: schraffierte Balken.

Da eine chronische Applikation von Schubspannung größere Relevanz für die *in vivo*-Situation hat, wurden alle folgenden Experimente bei 24 h Schubspannung durchgeführt. Die mRNA-Expression von ECE-1-Isoformen wurde durch Northern-Analysen mit Isoform-spezifischen Oligonukleotiden quantifiziert. Chronische Applikation von Schubspannung führt zu einer dosisabhängigen Herabregulation der in HUVEC vorherrschenden Isoform ECE-1a. Die ECE-Isoform ECE-1b wird ebenfalls durch Schubspannung herabreguliert (Abb.16).

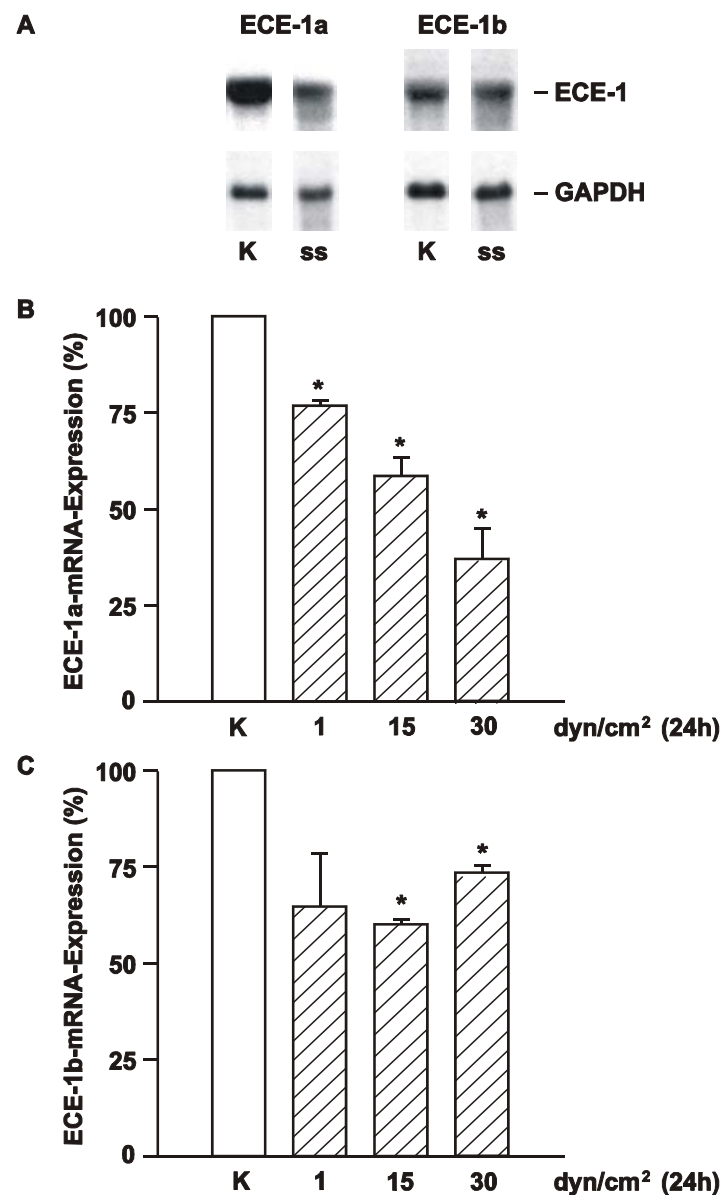


Abb. 16: Herabregulation von Endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1)-Isoformen durch chronische laminare Schubspannung (24 h) in HUVEC. Die Quantifizierung der ECE-1-Isoform-mRNA erfolgte durch Northern-Analysen mit Isoform-spezifischen Oligonukleotiden und nachfolgender Normalisierung durch GAPDH-Hybridisierung (A). Angaben in Prozent der Kontrolle (K) ohne Schubspannung, n=3, *P<0,05 zu Kontrolle. Stationäre Kontrolle: offene Balken, Schubspannung: schraffierte Balken.

Endothelzellen synthetisieren ständig ET-1 und setzen es in das Zellkulturmedium frei. Die basale ET-1-Freisetzung von stationären HUVEC-Kulturen variiert erheblich (0,3-1,9 pM/mg Protein/d, MW: $0,8 \pm 0,1$ pM/mg Protein/d, $n=14$). Daher wurde jedes Experiment mit einer zeitgleichen internen stationären Kontrolle durchgeführt, und die ET-1-Freisetzung auf diese Kontrolle normalisiert. Chronische Applikation von laminarer Schubspannung (24 h) führt zu einer dosisabhängigen Herabregulation der ET-1-Freisetzung (max.: auf 30% der stationären Kontrolle bei 30 dyn/cm^2) (Abb. 17).

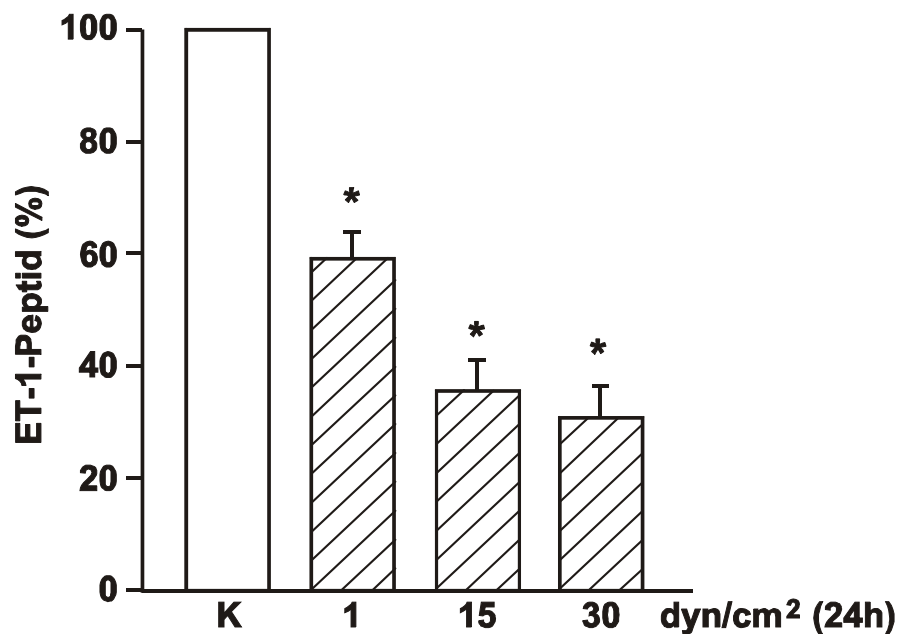


Abb. 17: Schubspannungsabhängige Herabregulation der Endothelin-1 (ET-1)-Freisetzung in HUVEC. Die HUVEC wurden laminarer Schubspannung für 24 h in einem Plattenkegelviskosimeter ausgesetzt. Die ET-1-Peptid-Freisetzung in das Zellkulturmedium wurde durch ET-ELISA quantifiziert. Angaben in Prozent der zeitgleichen internen Kontrolle (K) ohne Schubspannung, $n \geq 3$, * $P < 0,05$ zu Kontrolle. Stationäre Kontrolle: offener Balken, Schubspannung: schraffierte Balken.

Zur Aufklärung der zugrundeliegenden Signalmechanismen der schubspannungsabhängigen Herabregulation der ET-1-Synthese in HUVEC wurden Experimente ($n=3$) mit Inhibitoren der Proteinkinase C (PKC, $1 \mu\text{M}$ RO-31-8220) oder von Tyrosinkinase (1 μM Herbimycin A) durchgeführt. Eine Hemmung von PKC oder Tyrosinkinase hatte keinen Effekt auf die Herabregulation der PPET-1-mRNA und der ET-1-Peptid-Freisetzung durch arterielle laminare Schubspannung in HUVEC.

In weitergehenden Experimenten wurde der dosisabhängige Effekt von eNOS-Inhibitoren (L-NAME, L-NNA) auf die schubspannungsabhängige Herabregulation der ET-1-Synthese und -Freisetzung untersucht. Eine hohe eNOS-Inhibitordosis ($500 \mu\text{M}$ L-NAME) hemmt die

schubspannungsabhängige Herabregulation der PPET-1-mRNA-Expression durch arterielle laminare Schubspannung (24 h) in HUVEC (Abb. 18A). Eine ähnliche Tendenz konnte auf ET-1-Peptid-Ebene beobachtet werden, ohne statistische Signifikanz zu erreichen (Abb. 18B). Ähnliche Daten wurden mit dem eNOS-Inhibitor L-NNA erhalten.

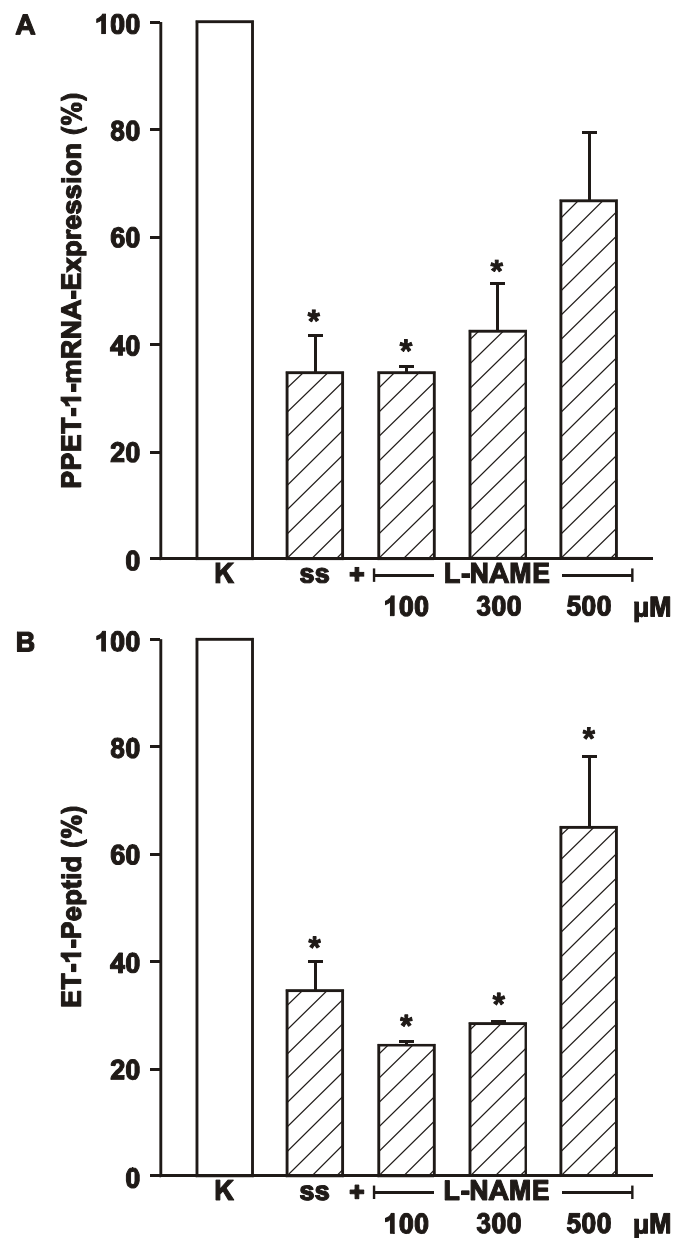


Abb. 18: Effekt von eNOS-Inhibitoren auf die schubspannungsabhängige Herabregulation der PPET-1-mRNA (A) und ET-1-Peptid-Freisetzung (B). HUVEC wurden arterieller Schubspannung (15 dyn/cm², 24 h) ohne bzw. mit eNOS-Inhibitor L-NAME ausgesetzt und die PPET-1-mRNA durch kompetitive RT-PCR (A) sowie die ET-1-Peptid-Freisetzung in das Zellkulturmedium durch ET-ELISA quantifiziert. Angaben in Prozent der zeitgleichen internen Kontrolle (K) ohne Schubspannung ohne bzw. mit L-NAME, n=3, *P<0,05 zu Kontrolle. Stationäre Kontrolle: offene Balken, Schubspannung: schraffierte Balken.

In vorangegangenen Studien konnten wir in Zusammenarbeit mit Prof. Brodde (Institut für Pharmakologie und Toxikologie der MLU) zeigen, daß Endothelzellen (HUVEC) im Gegensatz zur Neuroblastoma-Zelllinie SK-N-MC nur den ET_B-, jedoch nicht den ET_A-Rezeptor exprimieren (Heinroth-Hoffmann et al., 1998). Daher wurde in weitergehenden Analysen die Regulation des ET_B-Rezeptors durch Schubspannung in HUVEC untersucht. Die ET_B-mRNA-Expression wird durch chronische (24 h) laminare Schubspannung in HUVEC dosisabhängig gesteigert (Abb. 19A). Die schubspannungsabhängige Induktion der ET_B-mRNA kann durch Blockade der eNOS (100 - 500 µM L-NAME) und der PKC (1 µM RO-31-8220) gehemmt werden. Eine Hemmung von Tyrosinkinasen (1 µM Herbimycin A) hatte dagegen keinen Effekt (Abb. 19B).

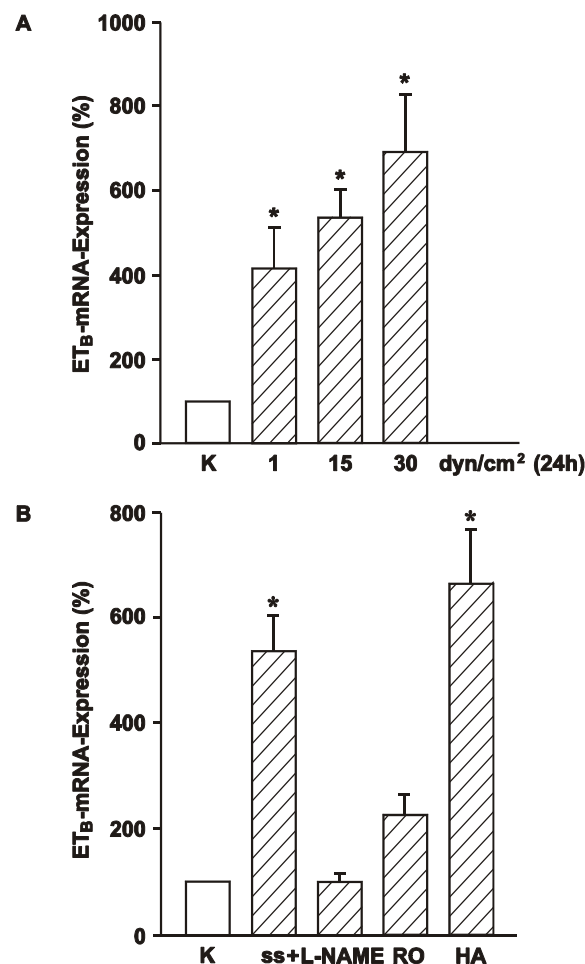


Abb. 19: Die Induktion der ET_B-mRNA-Expression durch laminare Schubspannung ist NO- und PKC-, jedoch nicht Tyrosinkinase-vermittelt. HUVEC wurden 24 h (A) Schubspannung ohne bzw. (B) arterieller Schubspannung (15 dyn/cm²) mit Inhibitoren der eNOS (L-NAME), der PKC (RO-31-8220, RO) bzw. von Tyrosinkinasen (Herbimycin A, HA) ausgesetzt und die ET_B-mRNA durch kompetitive RT-PCR quantifiziert. Angaben in Prozent der internen Kontrolle (K) ohne Schubspannung ohne bzw. mit Inhibitor, n=3, *P<0,05 zu Kontrolle. Stationäre Kontrolle: offene Balken, Schubspannung: schraffierte Balken.

Zur zeit- und kostengünstigeren mRNA-Quantifizierung wurde zusätzlich am Beispiel des ET_B-Rezeptors die Methode der seriellen multistandard-assistierten RT-PCR (smaRT-PCR) entwickelt (Szibor and Morawietz, 2001). Diese Methode quantifiziert die mRNA-Expression im Gegensatz zur klassischen kompetitiven PCR in nur einem Reaktionsgefäß mit vier seriell deletierten und verdünnten internen Standards. Die etablierte smaRT-PCR liefert äquivalente, reproduzierbare Meßergebnisse wie die kompetitive PCR bei insgesamt weniger RNA-Einsatz, geringerem Arbeitsaufwand und niedrigeren Kosten durch nur eine RT- bzw. PCR-Reaktion pro Probe.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, daß die Bildung des potenziell proatherosklerotischen Vasokonstriktors ET-1 durch laminare Schubspannung in Endothelzellen herabreguliert wird. Dies erfolgt auf der Ebene der PPET-1- und ECE-1-mRNA-Expression, während parallel der Endothelin-Rezeptor B durch Schubspannung induziert wird. Die ET_B-Induktion ist auch als antiatherosklerotischer Schutzmechanismus zu werten, da die ET_B-vermittelte NO-Freisetzung die Vasorelaxation steigert und die Blutplättchen-Aggregation hemmt.

4.1.5. Schubspannungsabhängige Expression von pro- bzw. antiapoptotischen Genen

Der Effekt von chronischer laminarer Schubspannung auf die Apoptoserate und die Expression von pro- bzw. antiapoptotischen Genen in humanen Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC) wurde untersucht (Bartling et al., 2000).

Die Apoptoserate von kultivierten HUVEC wurde durch Applikation von arterieller laminarer Schubspannung (15 oder 30 dyn/cm², 24 h) reduziert (Abb. 20). Im Gegensatz dazu hatte venöse laminare Schubspannung keinen signifikanten Effekt auf die Apoptoserate.

Die schubspannungsabhängige Expression des proapoptotischen Fas-Rezeptors und seiner antiapoptotischen löslichen Isoform FasExo6Del wurde in HUVEC untersucht (Abb. 21). Die Fas-mRNA-Expression wird durch laminare Schubspannung (1-30 dyn/cm², 24 h) herabreguliert. Die FasExo6Del-mRNA wird durch venöse Schubspannung (1 dyn/cm², 24 h) herabreguliert, durch arterielle Schubspannung (30 dyn/cm², 24 h) dagegen 1,6-fach induziert (Abb. 21A). Das daraus resultierende antiapoptotische mRNA-Expressionsverhältnis von FasExo6Del zu Fas ist dadurch bei arterieller Schubspannung von 30 dyn/cm² 2,3-fach erhöht (Abb. 21B). Die erhöhte FasExo6Del-mRNA-Expression bei arterieller Schubspannung konnte auf Proteinebene durch erhöhte Freisetzung von löslichem Fas-Protein in das Zellkulturmedium bestätigt werden (Abb. 21C).

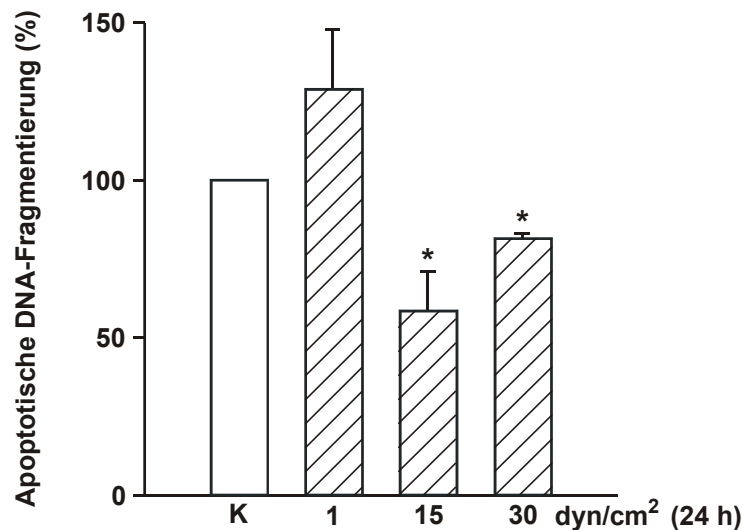


Abb. 20: Arterielle laminare Schubspannung verringert die apoptotische DNA-Fragmentierung in kultivierten humanen Endothelzellen. HUVEC wurden für 24 h in einem Plattenkegel-Viskosimeter venöser (1 dyn/cm²) oder arterieller Schubspannung (15 bzw. 30 dyn/cm²) ausgesetzt. Die Apoptoserate wurde durch Nachweis apoptotischer Histon-assoziiierter DNA-Fragmente durch ELISA quantifiziert. Angaben in Prozent der zeitgleichen internen Kontrolle (K) ohne Schubspannung, n=4, *P<0,05 zu Kontrolle. Stationäre Kontrolle: offener Balken, Schubspannung: schraffierte Balken.

Neben dem Fas-Rezeptor-Signalweg wurde die Regulation pro- und antiapoptotischer Mitglieder der Bcl-2-Genfamilie durch Schubspannung (24 h) auf mRNA- (Abb. 22) und Proteinebene in HUVEC analysiert. Die mRNA- und Proteinexpression des antiapoptotischen Bcl-x_L wird durch arterielle Schubspannung induziert (Abb. 22A). Das antiapoptotische Gen Bcl-2 wird auf mRNA- und Proteinebene durch arterielle Schubspannung nicht beeinflusst, dagegen durch venöse Schubspannung herabreguliert. Zusätzlich wird die antiapoptotische Mcl-1-mRNA durch arterielle Schubspannung von 30 dyn/cm² 1,4-fach induziert, jedoch durch niedrigere Schubspannung nicht reguliert. Obwohl eine niedrigere Apoptoserate durch arterielle Schubspannung in HUVEC beobachtet wurde, war überraschenderweise die mRNA- und Proteinexpression des potenziell proapoptotischen Bak durch arterielle Schubspannung erhöht (Abb. 22B). Venöse Schubspannung führt dagegen zu einer Herabregulation der Bak-mRNA-Expression. Daneben war auch die proapoptotische Bax-mRNA-Expression durch arterielle Schubspannung erhöht.

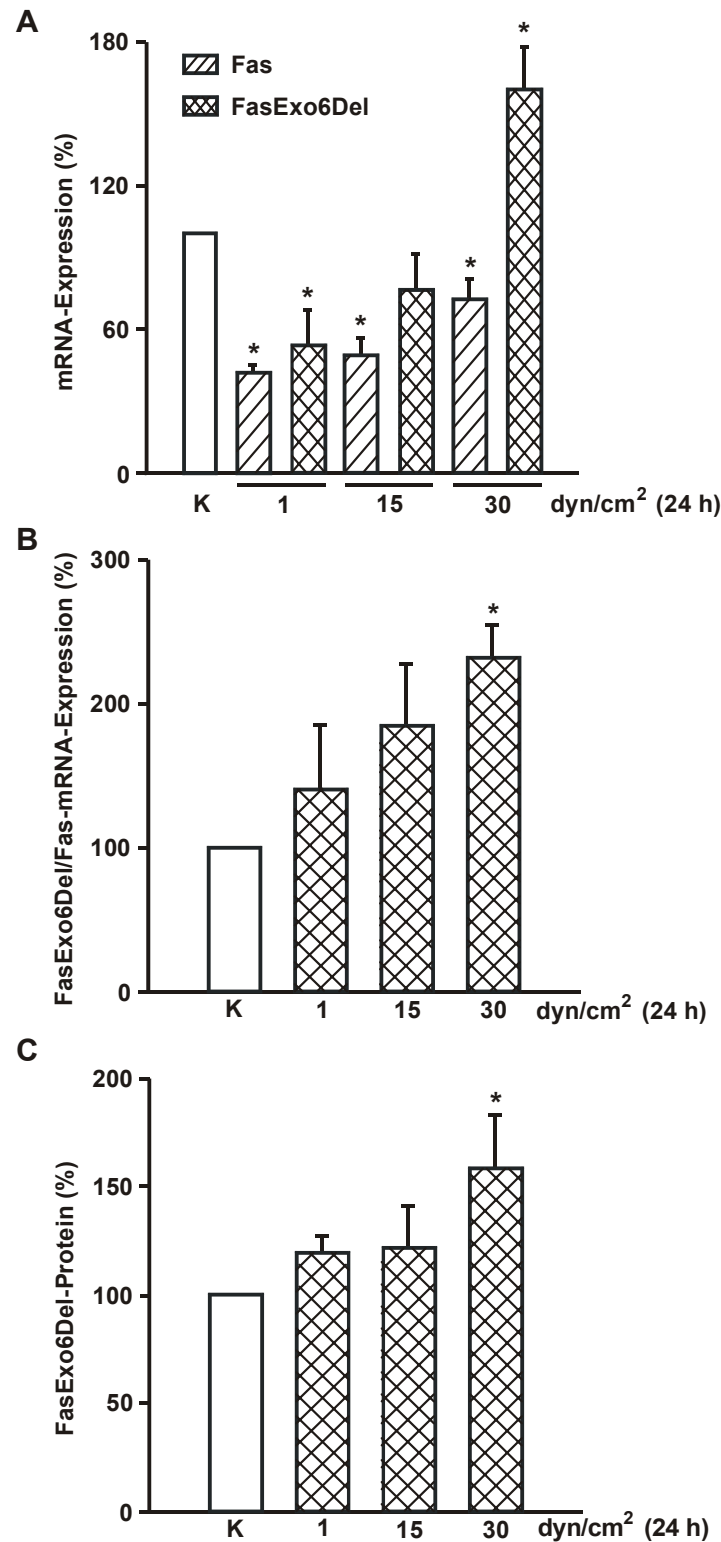


Abb. 21: Schubspannungsabhängige Expression von Fas und FasExo6Del in humanen Endothelzellen. Venöse (1 dyn/cm²) oder arterielle Schubspannung (15 bzw. 30 dyn/cm²) wurde für 24 h auf HUVEC appliziert. Die Expression des proapoptotischen Fas-Rezeptors und seiner antiapoptotischen, löslichen Isoform FasExo6Del wurde durch kompetitive RT-PCR quantifiziert (A). (B) Antiapoptotisches FasExo6Del/Fas-mRNA-Verhältnis. (C) Schubspannungsabhängige Freisetzung von löslichem FasExo6Del-Protein in das Kulturmedium. Angaben in Prozent der zeitgleichen internen Kontrolle (K) ohne Schubspannung, n=4, *P<0,05 zu Kontrolle.

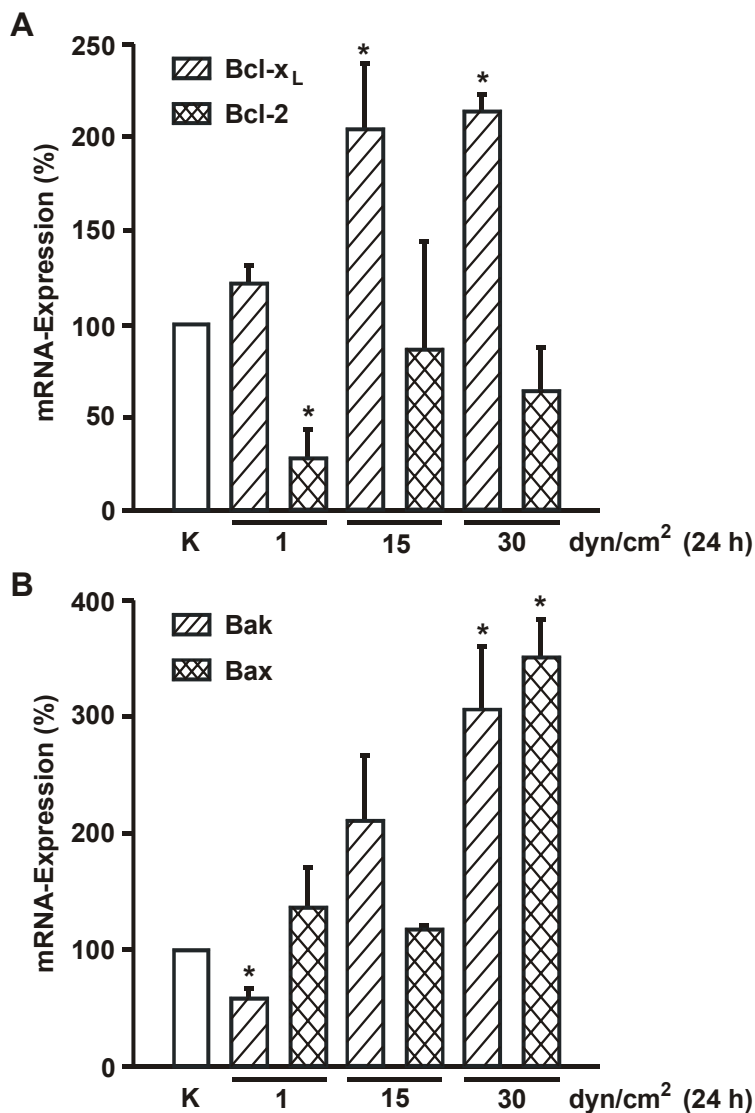


Abb. 22: Effekt von Schubspannung auf die Expression von Genen der Bcl-2-Familie in humanen Endothelzellen. Laminare venöse (1 dyn/cm²) oder arterielle Schubspannung (15 bzw. 30 dyn/cm²) wurde für 24 h auf HUVEC appliziert. Die mRNA-Expression von antiapoptotischen (A: Bcl-x_L, Bcl-2) und proapoptotischen (B: Bak, Bax) Genen der Bcl-2-Familie wurde durch standard-kalibrierte kompetitive RT-PCR quantifiziert. Angaben in Prozent der zeitgleichen internen Kontrolle (K) ohne Schubspannung, n≥3, *P<0,05 zu Kontrolle.

Da Schubspannung die NO-Synthese in Endothelzellen steigert, wurde der Effekt einer eNOS-Hemmung (100 µM L-NNA) auf die schubspannungsabhängige Regulation von pro- bzw. antiapoptotischen Genen untersucht (Abb. 23). Die Induktion der mRNA-Expression des antiapoptotischen Bcl-x_L und des proapoptotischen Bak in HUVEC bei arterieller Schubspannung wurde durch eNOS-Hemmung blockiert. Die schubspannungsabhängige Expression des proapoptotischen Bax wurde durch eNOS-Hemmung erhöht. Die Expression der antiapoptotischen Gene Bcl-x_L und Bcl-2 wurde durch eNOS-Hemmung bereits unter

Basalbedingungen herabreguliert. Die Expression des proapoptotischen Fas-Rezeptors und der antiapoptotischen FasExo6Del und Mcl-1 wurde durch eNOS-Inhibition in stationären Kulturen und durch Schubspannung nicht beeinflusst.

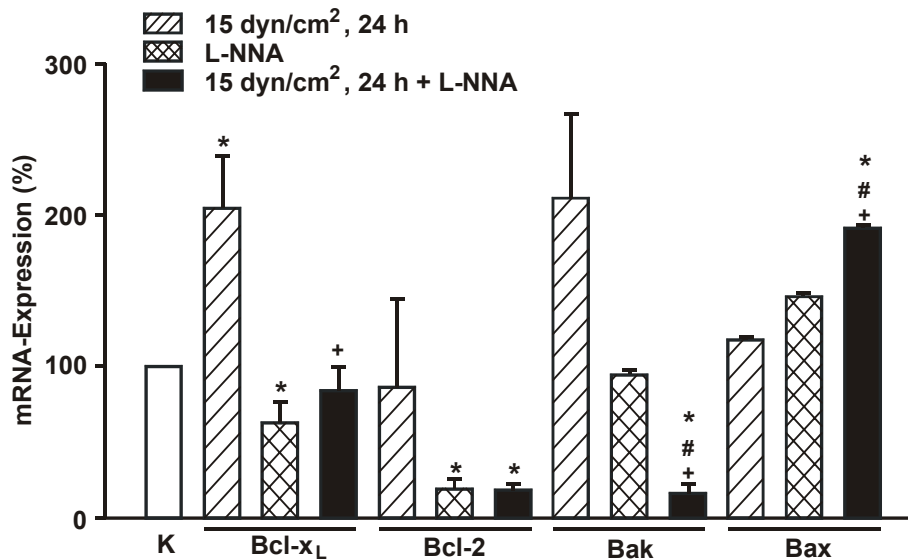


Abb. 23: Effekt von eNOS-Hemmung auf die schubspannungsabhängige Expression von Genen der Bcl-2-Familie in humanen Endothelzellen. HUVEC wurden arterieller Schubspannung (15 dyn/cm², 24 h) ohne bzw. mit eNOS-Inhibitor L-NNA (100 µM) ausgesetzt und die mRNA-Expression von antiapoptotischen (Bcl-x_L, Bcl-2) und proapoptotischen (Bak, Bax) Genen der Bcl-2-Familie durch standard-kalibrierte kompetitive RT-PCR quantifiziert. Angaben in Prozent der zeitgleichen internen Kontrolle (K) ohne Schubspannung ohne bzw. mit L-NNA, n≥3, *P<0,05 zu spezifischer Kontrolle.

Damit konnte eine verringerte Apoptoserate durch Applikation arterieller laminarer Schubspannung auf kultivierte humane Endothelzellen gezeigt werden. Diese kann durch Herabregulation proapoptotischer Gene (Fas) und Induktion antiapoptotischer Genprodukte (FasExo6Del, Bcl-x_L, Mcl-1) vermittelt sein. Daneben werden jedoch auch potenziell proapoptotische Genprodukte (Bak, Bax) durch arterielle Schubspannung induziert. Die basale und schubspannungsabhängige Expression von pro- bzw. antiapoptotischen Genen ist in HUVEC z.T. NO-vermittelt.

4.1.6. Regulation der Transkriptionsfaktoren Egr-1 und AP-1 durch Schubspannung in Endothelzellen

Um den Mechanismus der biomechanischen Regulation der mRNA-Expression detaillierter zu analysieren, wurde der Effekt von Schubspannung auf die Expression und Aktivität von Transkriptionsfaktoren in Endothelzellen untersucht. Die Arbeiten wurden auf die Transkriptionsfaktoren “Early growth response gene-1” (Egr-1) und “Activator protein-1” (AP-1) konzentriert.

Zunächst wurde die zeit- und dosiabhängige Regulation der Egr-1-mRNA-Expression durch laminare Schubspannung in humanen Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC) untersucht. Die Egr-1-mRNA-Expression wird durch laminare Schubspannung ($1\text{--}30\text{ dyn/cm}^2$) nach 30 min transient induziert und ist bereits nach 2 h wieder auf Kontrollniveau. Die Egr-1-mRNA-Induktion durch Schubspannung erfolgt dosisabhängig (max. 30 dyn/cm^2). Die Signaltransduktion der Egr-1-mRNA-Induktion wurde durch Applikation von arterieller laminarer Schubspannung (15 dyn/cm^2 , 30 min) mit Inhibitoren der PKC ($1\text{ }\mu\text{M}$ RO-31-8220), des Angiotensin II-Rezeptors Typ 1 (AT_1 , $1\text{ }\mu\text{M}$ Losartan), des Endothelin-Rezeptors B (ET_B , $1\text{ }\mu\text{M}$ BQ-788) bzw. der endothelialen NO-Synthase (eNOS, $100\text{ }\mu\text{M}$ L-NNA) analysiert (Abb. 24). Die Egr-1-mRNA-Induktion durch Schubspannung ist partiell PKC- und ET_B -, jedoch nicht AT_1 - oder eNOS-vermittelt.

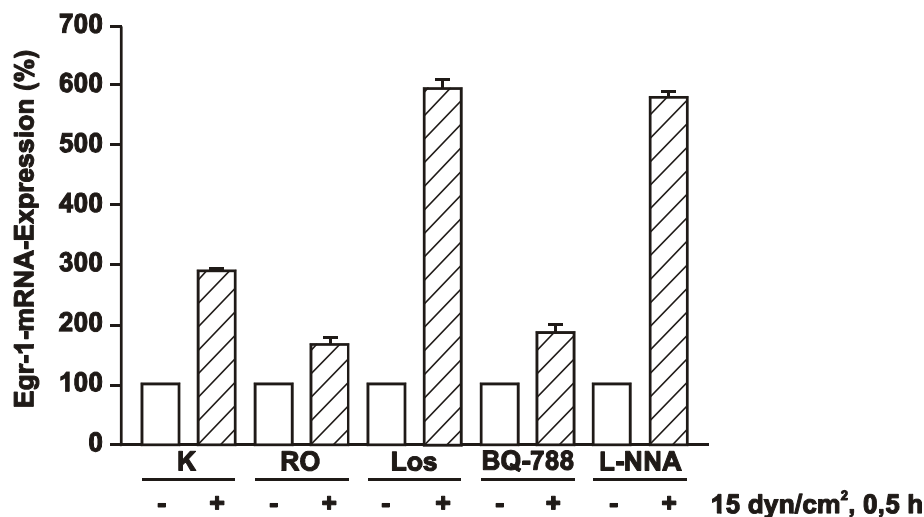


Abb. 24: Induktion der Egr-1-mRNA-Expression durch Schubspannung in humanen Endothelzellen. HUVEC wurden arterieller laminarer Schubspannung (15 dyn/cm^2 , 0,5 h) ohne bzw. mit Inhibitoren der PKC ($1\text{ }\mu\text{M}$ RO-31-8220, RO), des AT_1 -Rezeptors ($1\text{ }\mu\text{M}$ Losartan, Los), des ET_B -Rezeptors ($1\text{ }\mu\text{M}$ BQ-788) bzw. der eNOS ($100\text{ }\mu\text{M}$ L-NNA) ausgesetzt und die Egr-1-mRNA-Expression durch Northern-Analyse quantifiziert. Angaben in Prozent der zeitgleichen internen Kontrolle (K) ohne Schubspannung ohne bzw. mit Inhibitor (n=3). Stationäre Kontrolle: offene Balken, Schubspannung: schraffierte Balken.

AP-1 kann ein c-jun-Homodimer oder ein c-jun-c-fos-Heterodimer sein. Daher wurde in ersten Experimenten die Regulation der c-jun- und c-fos-mRNA-Expression durch Schubspannung in HUVEC untersucht. Arterielle laminare Schubspannung induziert transient die c-jun-, jedoch nicht die c-fos-mRNA (2-fach, max. 30 min). Diese Induktion der c-jun-mRNA durch Schubspannung ist PKC-, ET_B - und eNOS-, jedoch nicht AT_1 -vermittelt (Abb. 25).

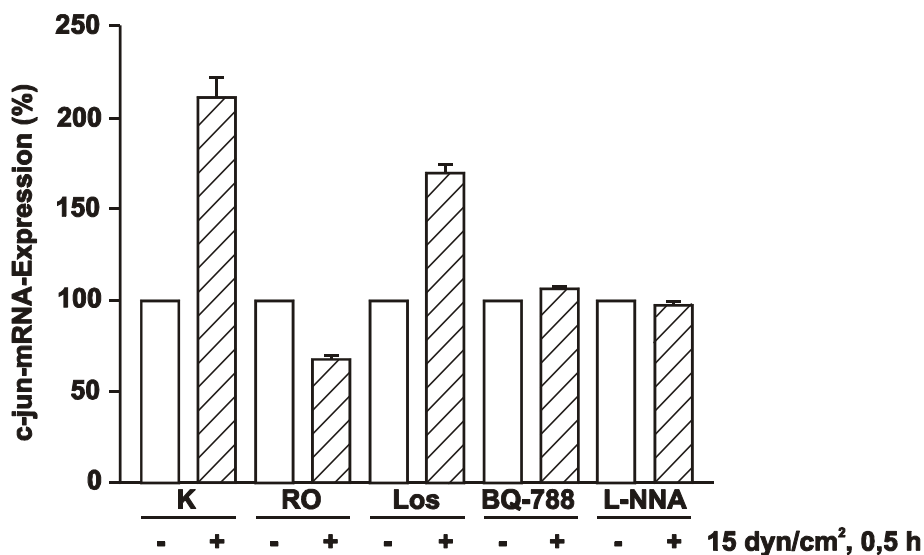


Abb. 25: Schubspannungsabhängige Induktion der c-jun-mRNA-Expression in humanen Endothelzellen. HUVEC wurden arterieller laminarer Schubspannung (15 dyn/cm^2 , 0,5 h) ohne bzw. mit Inhibitoren der PKC ($1 \mu\text{M}$ RO-31-8220, RO), des AT_1 -Rezeptors ($1 \mu\text{M}$ Losartan, Los), des ET_B -Rezeptors ($1 \mu\text{M}$ BQ-788) bzw. der eNOS ($100 \mu\text{M}$ L-NNA) ausgesetzt und die c-jun-mRNA-Expression durch Northern-Analyse quantifiziert. Angaben in Prozent der zeitgleichen internen Kontrolle (K) ohne Schubspannung ohne bzw. mit Inhibitor ($n=3$). Stationäre Kontrolle: offene Balken, Schubspannung: schraffierte Balken.

Die funktionelle Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 durch Schubspannung in Endothelzellen wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Wagner (Georg-August-Universität Göttingen) durch “electrophoretic mobility shift assay” (EMSA) quantifiziert. Die Bindung des Transkriptionsfaktors AP-1 an seine Konsensussequenz war nach 1 h arterieller Schubspannung in HUVEC maximal aktiviert. Chronische Applikation von arterieller Schubspannung (24 h , 15 dyn/cm^2) führte dagegen zu einer Herabregulation der AP-1-Transkriptionsfaktorbindungsaktivität (Abb. 26A). Durch “supershift”-Analyse konnte gezeigt werden, daß der basal nachweisbare und durch Schubspannung aktivierte Faktor AP-1 c-jun-, jedoch nicht c-fos enthält (Abb. 26B). Die Spezifität der AP-1-Bindung wurde parallel durch Competition mit nicht markierten Bindungsstellen im Überschuß gezeigt.

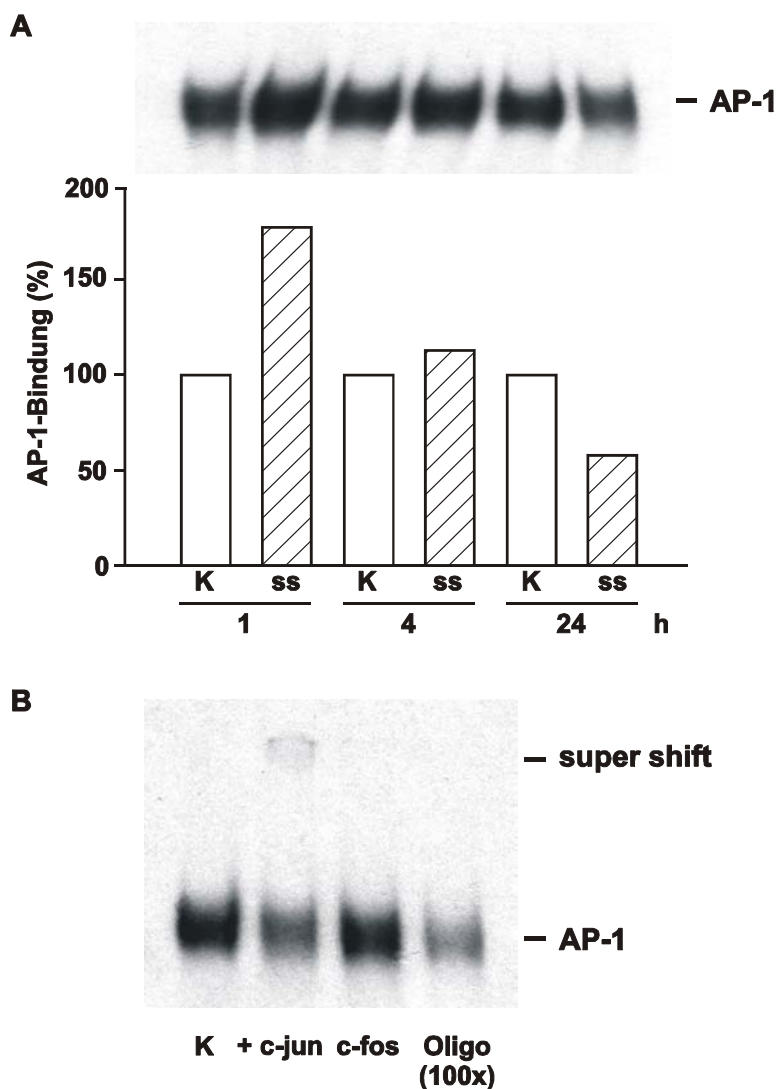


Abb. 26: Regulation der Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 durch Schubspannung in humanen Endothelzellen. HUVEC wurden arterieller Schubspannung (ss, 15 dyn/cm²) ausgesetzt und die AP-1-Bindung durch “electrophoretic mobility shift assay” (EMSA) in Prozent der zeitgleichen Kontrolle (K) ohne Schubspannung quantifiziert (A). Die Zusammensetzung des AP-1-Komplexes wurde durch “super shift”-Analyse mit c-jun- bzw. c-fos-Antikörpern, sowie die Spezifität der AP-1-Bindung durch Konkurrenz mit nicht markierten Bindungsstellen im 100-fachen Überschuß untersucht (B). Stationäre Kontrolle: offene Balken, Schubspannung: schraffierte Balken.

Damit konnte eine transiente Induktion der Transkriptionsfaktoren Egr-1 und AP-1 durch Applikation von arterieller laminarer Schubspannung in HUVEC gezeigt werden. Diese Induktion erfolgt auf einem PKC- und ET_B-abhängigen Signalweg, in den z.T. NO involviert ist. Chronische Applikation von arterieller Schubspannung führt dagegen zu einer Herabregulation der Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1.

4.1.7. Induktion von Egr-1 und c-jun durch Dehnung in glatten Gefäßmuskelzellen

Glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) der Rattenaorta wurden auf elastischen Silikonmembranen durch rhythmische Applikation eines Vakuums von 1 Hz mit Hilfe einer Flexcell-Dehnungsapparatur im Labor von Harlan E. Ives, Cardiovascular Research Institute, University of California, San Francisco, gedehnt (Morawietz et al., 1999a). Zyklische mechanische Dehnung (1 Hz, 25%) von VSMC induziert transient die mRNA-Expression der “immediate-early”-Gene Egr-1- und c-jun-, jedoch nicht c-fos ($n \geq 4$) (Abb. 27). Eine erhöhte Egr-1- (6,1-fach) und c-jun- (1,4-fach) mRNA-Expression war bereits nach 15 min zyklischer Dehnung nachweisbar. Die maximale mRNA-Expression erreichten beide Gene nach 30 min (Egr-1: 9,7-fach, c-jun: 5,1-fach), um anschließend (Egr-1: nach 4 h, c-jun: nach 2 h) wieder das basale Expressionsniveau zu erreichen. Im Gegensatz dazu wurde die c-fos-mRNA-Expression durch zyklische Dehnung in VSMC nicht beeinflusst.

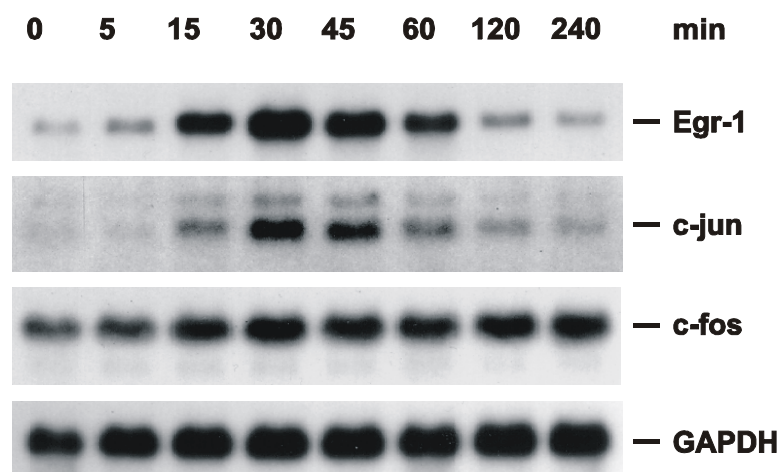


Abb. 27: Zeitabhängige Regulation der mRNA-Expression der “immediate-early”-Gene Egr-1, c-jun und c-fos durch zyklische Dehnung in glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC). VSMC wurden auf Typ-I-Kollagen-beschichteten Silikonmembranen für die genannten Zeiten zyklisch gedehnt (1 Hz, 25%). Die Egr-1-, c-jun-, und c-fos-mRNA-Expression wurde durch Northern-Analysen quantifiziert und auf GAPDH normalisiert.

In weitergehenden Experimenten wurde getestet, ob die Herabregulation der nach 30 min induzierten Egr-1- und c-jun-mRNA eine *de novo*-Proteinsynthese erfordert. Dabei wurden VSMC für bis zu 6 h mit bzw. ohne den Inhibitor einer *de novo*-Proteinsynthese Cycloheximid (35 μ M) stationär inkubiert oder zyklisch gedehnt. Cycloheximid hatte unter stationären Kulturbedingungen nur einen geringen Effekt auf beide Gene, verhinderte jedoch die Herabregulation und verlängerte (für mindestens 6 h) und verstärkte (“superinduction”)

die durch zyklische Dehnung induzierte mRNA-Expression von Egr-1 und c-jun. Die c-fos-mRNA-Expression wurde auch mit Cycloheximid durch zyklische Dehnung nicht reguliert. Die Herabregulation der durch zyklische Dehnung induzierten Egr-1- und c-jun-mRNA erfordert somit eine *de novo*-Proteinsynthese in VSMC.

Der Schwellenwert der Induktion der Egr-1- und c-jun-mRNA-Expression durch zyklische Dehnung (30 min) in VSMC betrug bei beiden Genen 5% (Egr-1: 2,4-fache; c-jun: 1,4-fache Induktion) (Abb. 28). Die Egr-1-mRNA wurde dosiabhängig durch verstärkte Dehnung induziert (10%: 6,9-fach bis 25%: 9,4-fach, n=3). Die c-jun-mRNA erreichte bereits bei 10% Dehnung eine 4,2-fache Induktion, die auch durch Steigerung auf bis zu 25% (4,5-fach) nicht weiter signifikant gesteigert werden konnte. Die Egr-1-mRNA wird somit ca. 2-fach stärker durch Dehnung in VSMC induziert, als die c-jun-mRNA.

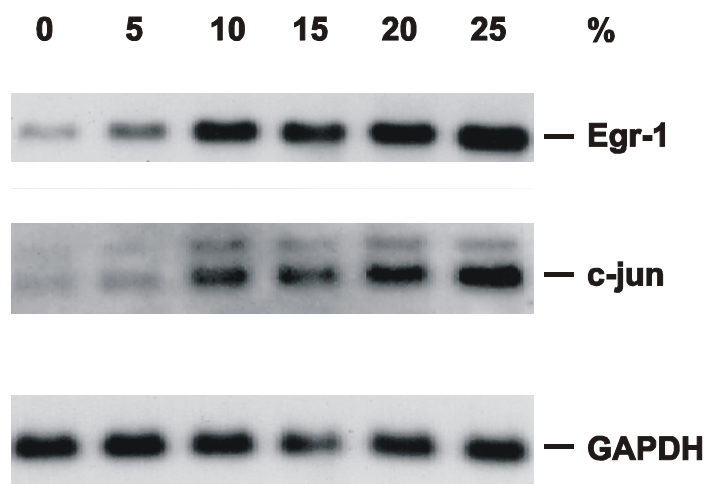


Abb. 28: Bestimmung des Schwellenwertes der Induktion der Egr-1- und c-jun-mRNA durch zyklische Dehnung in glatten Muskelzellen. VSMC wurden für 30 min bei den angegebenen Werten auf Typ-I-Kollagen-beschichteten Silikonmembranen zyklisch gedehnt (1 Hz). Die Egr-1- und c-jun-mRNA-Expression wurde durch Northern-Analysen quantifiziert und auf GAPDH normalisiert.

Anschließend wurde die minimal notwendige Zeit zur Induktion beider Gene durch zyklische Dehnung bestimmt. VSMC wurden für unterschiedliche Zeiten zyklisch gedehnt und anschließend stationär ohne Dehnung bis zu einer Gesamtzeit von 30 min inkubiert, um den Zellen die Möglichkeit zu geben, die Egr-1-mRNA nach erfolgter Stimulation zu synthetisieren. Überraschenderweise war bereits eine einmalige Dehnung (25%) von 1 sec Dauer ausreichend, sowohl die Egr-1- (4,6-fach), als auch die c-jun-mRNA (2,4-fach) zu induzieren. Die mRNA-Expression beider Gene wurden durch mechanische Stimulation mit

zusätzlichen Zyklen von Dehnung/Relaxation dosisabhängig gesteigert. Der Schwellenwert einer Induktion der mRNA-Expression durch einen einzigen Zyklus mechanischer Dehnung betrug bei Egr-1 10% (1,5-fach) und bei c-jun 20% (1,7-fach). Eine höhere Dehnungsamplitude steigerte dosisabhängig die Egr-1- und c-jun-mRNA-Expression (max. bei 25%). Der Zeitverlauf der Egr-1-mRNA-Expression nach Stimulation durch einen Einzelzyklus (1 sec, 25%) zeigte in Analogie zur zyklischen Dehnung ein Induktion bereits nach 15 min (2,6-fach) mit einem Maximum nach 30 min (4-fache Induktion). Die Egr-1-mRNA war bereits 2 h nach dem Einzelzyklus wieder auf Basalniveau. Zyklische Dehnung führte jedoch zu einer stärkeren Induktion der Egr-1-mRNA in VSMC, als Dehnung durch einen Einzelzyklus.

Um eine mögliche Regulation der mRNA-Expression auf transkriptioneller Ebene nachzuweisen, wurden Egr-1-Promotordeletions-Reportergen-Konstrukte in VSMC transfiziert und anschließend gedehnt (Abb. 29).

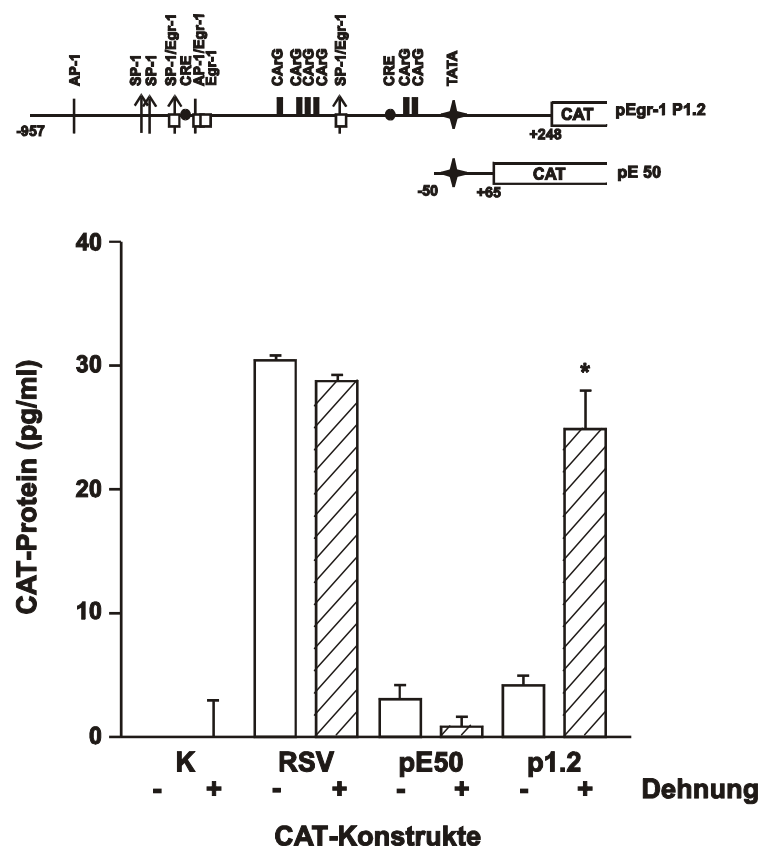


Abb. 29: Induktion eines Egr-1-Promotor-CAT-Konstruktes durch mechanische Dehnung. VSMC wurden auf Typ I-Kollagen-Platten mit RSV β -Gal als Transfektionskontrolle (K), sowie RSV-CAT (RSV) oder den dargestellten Egr-1-Promotor-CAT-Konstrukten pE50 bzw. P1.2 transfiziert und anschließend zyklisch (1 Hz, 25%) gedehnt (n=3). Das CAT-Protein wurde durch ELISA quantifiziert. Offene Balken: stationäre Kultur, schraffierte Balken: Dehnung.

Das “full-length”-Egr-1-Promotor-CAT-Konstrukt pEgr-1 P1.2 wurde durch mechanische Dehnung in VSMC induziert (5,9-fach, n=4). Dagegen erfolgte keine Induktion des “minimal”-Egr-1-Promotor-CAT-Konstrukts pE50 oder des RSV-CAT-Konstrukts durch Dehnung in VSMC. Dadurch konnte gezeigt werden, daß die Induktion der Egr-1-mRNA durch Dehnung in VSMC auf transkriptioneller Ebene durch Bindung eines Transkriptionsfaktors im Egr-1-Promotorbereich von -957 bis -50 erfolgen kann.

Der Einfluß unterschiedlicher extrazellulärer Matrixproteine auf die dehnungsabhängige Induktion von Egr-1 und c-jun wurde in Experimenten mit Typ-I-Kollagen (Col I)-, Pronectin (FN)- oder Laminin (LN)-beschichteten Silikonmembranen getestet. Um die zelleigene Matrixsynthese zu minimieren, wurden diese Experimente mit konfluenten VSMC-Kulturen bereits 24 h nach Plattierung durchgeführt. Die Egr-1- und c-jun-mRNA wurde auf Col I (Egr-1: 2,8-fach, c-jun: 2,4-fach) und FN (Egr-1: 2,6-fach, c-jun: 2,1-fach) im Vergleich zur mRNA-Expression auf der gleichen Matrix ohne Dehnung induziert. Der Zeitverlauf der Induktion beider Gene war identisch auf Col I und FN (max. bei 30 min). Im Gegensatz dazu wurde die Egr-1-mRNA nicht auf LN-Platten durch Dehnung induziert (0,9-fach). Auch die c-jun-mRNA wurde auf LN-Platten signifikant geringer (1,6-fach, n=4, $P<0,001$) induziert, als auf Col I oder FN. Dies war z.T. auf die erhöhte basale Expression von Egr-1 (1,7-fach) und c-jun (1,4-fach) auf LN zurückzuführen. Die Egr-1-mRNA-Expression wurde jedoch im Vergleich zu c-jun auch geringer auf LN induziert.

Die Egr-1-Proteinexpression in VSMC nach zyklischer Dehnung wurde durch Western-Analysen untersucht (Abb. 30). Zyklische Dehnung (1 Hz, 25%) induziert die Egr-1-Proteinexpression bereits nach 30 min (1,3-fach). Die maximale Egr-1-Induktion erfolgt auf Proteinebene nach 1 h Dehnung (2,1-fach) und geht danach wieder auf Basalniveau zurück. Die dehnungsinduzierte Egr-1-Expression zeigt auf Proteinebene somit einen vergleichbaren zeitlichen Verlauf im Verhältnis zu der vorhergehenden mRNA-Expression.



Abb. 30: Regulation des Egr-1-Proteins durch Dehnung in VSMC. VSMC wurden auf Col I-Platten zyklisch (1 Hz, 25%) gedehnt. Die Proteinexpression wurde durch Western-Analysen mit Egr-1-Antikörpern quantifiziert.

Schließlich wurde die intrazelluläre Verteilung des Egr-1-Proteins in stationären und gedehnten VSMC untersucht (Abb. 31). Dabei wurde zyklische Dehnung von 30 min (mit anschließender stationärer Inkubation für 30 min) bzw. 60 min (1 Hz, max. 25%, Col I) appliziert. In stationären VSMC-Kulturen ist das Egr-1-Protein in granulären Strukturen im perinukleären Raum nachweisbar (Abb. 31A). Nach 30 min zyklischer Dehnung wurde keine Veränderung der Egr-1-Verteilung in Zellen im Zentrum der Platte beobachtet, die aufgrund der Geometrie der Flexcell-Platte nur minimaler Dehnung (<5%) ausgesetzt waren (Abb. 31B). In Zellen der Peripherie der Schale mit maximaler Dehnung erfolgte dagegen eine Translokation des Egr-1-Proteins von perinukleären Raum in den Zellkern (Abb. 31C). Ähnliche Daten wurden nach 1 h Dehnung beobachtet.

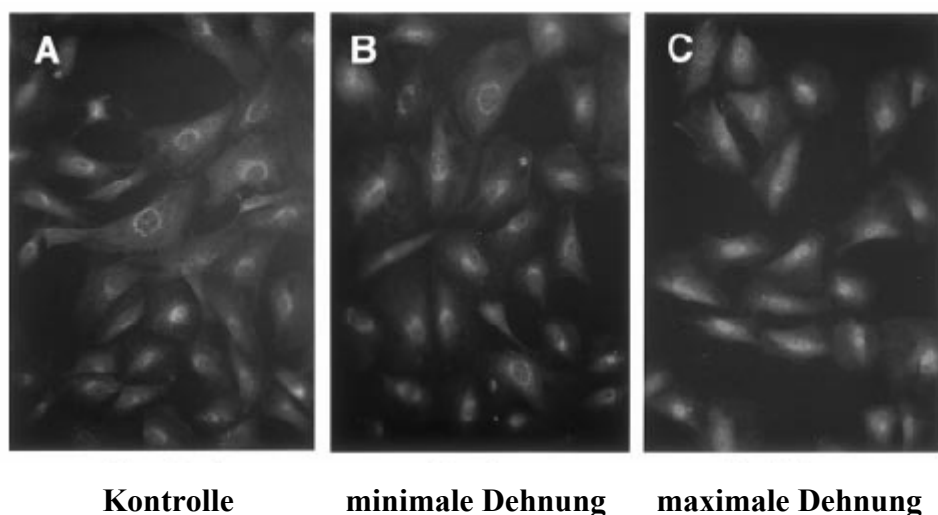


Abb. 31: Intrazelluläre Translokation des Egr-1-Proteins durch Dehnung in VSMC. VSMC wurden 30 min gedehnt (1 Hz, max. 25%, Col I) und anschließend 30 min stationär kultiviert. In Zellen nach stationärer Kultur (Kontrolle), aus dem Zentrum der gedehnten Platte (minimale Dehnung, <5%) oder der Peripherie der Platte (maximale Dehnung, 25%) wurde das Egr-1-Proteins durch Immunfluoreszenz nachgewiesen. In Zellen der Peripherie mit maximaler Dehnung erfolgte eine Translokation des Egr-1-Proteins von perinukleären Raum in den Zellkern (C).

Damit konnte eine Induktion der Egr-1- und c-jun-Expression durch Dehnung in VSMC gezeigt werden. Bereits ein mechanische Dehnung von 1 sec ist ausreichend, eine transkriptionelle Induktion in VSMC auszulösen. Die Induktion beider Gene erfolgt in Abhängigkeit von der extrazellulären Matrix. Darüber hinaus konnte eine dehnungsabhängige Translokation des Egr-1-Proteins vom perinukleären Raum in den Zellkern beobachtet werden, die typisch für eine Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors ist.

4.2. Induktion von Superoxidanionbildung und oxLDL-Aufnahme in Endothelzellen

Oxidativer Streß durch Superoxidanionbildung und die Aufnahme von oxidativ modifiziertem Low-Density-Lipoprotein (oxLDL) werden als proatherosklerotische Risikofaktoren in der Gefäßwand angesehen. Neben funktionell ähnlichen Proteinen in den Zellen der Immunabwehr konnten in den letzten Jahren auch in Endothelzellen eine NAD(P)H-Oxidase als Hauptquelle für Superoxidanionen und mit LOX-1 ein oxLDL-Rezeptor nachgewiesen werden. Ziel der folgenden Arbeiten war daher die molekulare Charakterisierung der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten und ein besseres Verständnis der Regulation von Expression und Aktivität der NAD(P)H-Oxidase und des LOX-1-Rezeptors durch die potenziell proatherosklerotischen Stimuli Angiotensin II (Ang II), Endothelin-1 (ET-1) bzw. oxLDL in humanen Endothelzellen (Morawietz et al., 1999b; Duerschmidt et al., 2000; Sohn et al., 2000a).

4.2.1. Nachweis und molekulare Charakterisierung von NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten in humanen Endothelzellen

Die NAD(P)H-Oxidase aus Endothelzellen zeigt im Vergleich zum bisher besser charakterisierten granulocytären Enzym eine veränderte Substratspezifität (NADH gegenüber NADPH bevorzugt) und Kinetik (eher konstitutive Superoxidanionbildung auf niedrigerem Niveau, als "oxidative burst"-artige Aktivierung). Zur Aufklärung der zugrundeliegenden molekularen Ursachen wurden zunächst die 4 bekannten Untereinheiten der granulocytären NAD(P)H-Oxidase (gp91phox, p22phox, p47phox und p67phox) durch RT-PCR aus der RNA von Primärkulturen humaner Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC) und der humanen Endothelzelllinie ECV304 amplifiziert.

Um eine Kontamination der Primärkulturen mit Granulocyten auszuschließen, wurden die gesamten kodierenden Bereiche der potenziell substratbindenden Untereinheiten gp91phox und p67phox, sowie Teilsequenzen der Untereinheiten p22phox und p47phox aus der Endothelzelllinie ECV304 kloniert und sequenziert. Im gesamten kodierenden Bereich der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit gp91phox aus Endothelzellen wurde kein Unterschied zur bekannten Sequenz aus Granulocyten gefunden (Abb. 32). In p67phox konnten 2 Basenpaaraustausche zwischen Granulocyten und Endothelzellen ($T_{895} \rightarrow C$, $A_{983} \rightarrow G$) nachgewiesen werden. Von diesen Austauschen ist die erste eine stille Mutation ($Leu_{299} \rightarrow Leu$), während die zweite Mutation zu einem konservativen Austausch zweier basischer Aminosäuren ($LyS_{328} \rightarrow Arg$) führt. In den untersuchten Teilsequenzen des kodierenden

Bereiches der p22phox- und p47phox-cDNA konnten keine Unterschiede zwischen Granulocyten und Endothelzellen nachgewiesen werden.



Abb. 32: Klonierung und Sequenzierung der potenziell substratbindenden NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten gp91phox und p67phox aus humanen Endothelzellen. Die kodierenden Bereiche der gp91phox- und p67phox-cDNAs wurden aus der Endothelzelllinie ECV304 kloniert und sequenziert. Im gesamten kodierenden Bereich von gp91phox wurde kein Unterschied zwischen Granulocyten und Endothelzellen gefunden. In p67phox wurden 2 Basenpaaraustausche zwischen Granulocyten und Endothelzellen ($T_{895} \rightarrow C$, $A_{983} \rightarrow G$) nachgewiesen, die eine stille Mutation ($Leu_{299} \rightarrow Leu$), bzw. einen konservativen Aminosäureaustausch ($Lys_{328} \rightarrow Arg$) bewirken (bp: Basenpaare, AS: Aminosäuren).

Damit konnte gezeigt werden, daß die Endothelzellen alle 4 essentiellen Untereinheiten der granulocytären NAD(P)H-Oxidase exprimieren. Da die einzigen nachgewiesenen molekularen Veränderungen in der p67phox-cDNA-Sequenz bekannte Polymorphismen ohne funktionelle Konsequenzen auf die NAD(P)H-Oxidase-Aktivität sind, wurden im folgenden vergleichende Analysen zur relativen Expression der 4 NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten in Granulocyten und Endothelzellen durchgeführt.

Die relative mRNA-Expression der 4 NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten wurde durch standard-kalibrierte kompetitive RT-PCR mit Hilfe eines gemeinsamen Multistandards quantifiziert, der Primerbindungsstellen für alle 4 Untereinheiten besitzt (Abb. 33A). Die Untereinheiten p22phox und p47phox (45% bzw. 167% der granulocytären Expression) werden in Endothelzellen und Granulocyten auf vergleichbarem Niveau exprimiert, während p67phox und gp91phox (2,5% bzw. 1,1% der granulocytären Expression) in Endothelzellen deutlich niedriger exprimiert sind, als in Granulocyten. Die Unterschiede zwischen Endothelzellen und Granulocyten in der gp91phox-mRNA-Expression korrelieren mit vergleichbaren Unterschieden in der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität in beiden Zelltypen (Abb.

33B). Die maximale NAD(P)H-Oxidase-Aktivität nach Stimulation mit PMA entspricht in Endothelzellen 1% der Superoxidanionbildung in Granulocyten.

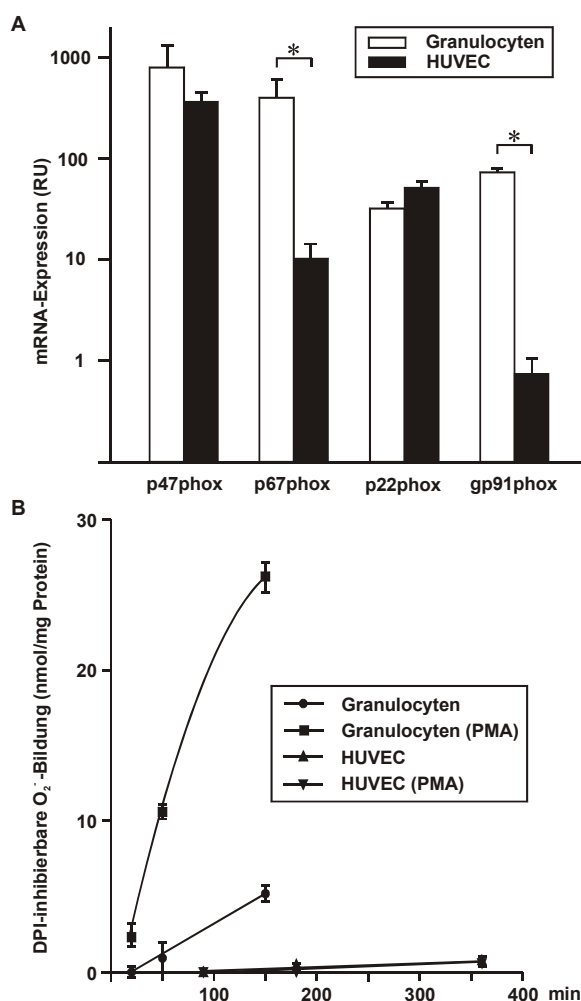


Abb. 33: Vergleich der relativen Untereinheiten-mRNA-Expression und der Aktivität der NAD(P)H-Oxidase zwischen humanen Granulocyten und Endothelzellen (HUVEC). A: Vergleich der mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten p47phox, p22phox, p67phox und gp91phox (in relative units, RU) durch Multistandard-kalibrierte kompetitive RT-PCR zwischen Granulocyten und Endothelzellen. B: Vergleich der basalen und durch Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) stimulierten Superoxidanionenbildung in Granulocyten und Endothelzellen durch DPI-inhibierbare O_2^- -Bildung im Cytochrom c-Assay. * $P < 0,05$.

Damit konnte die deutlich niedrigere Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten gp91phox und p67phox als mögliche molekulare Ursache für die im Vergleich zu Granulocyten niedrigere Superoxidanionbildung in Endothelzellen identifiziert werden. Da gp91phox auf mRNA-Ebene die in HUVEC am niedrigsten exprimierte Untereinheit ist, ist ihre Expression für die NAD(P)H-Oxidase-Aktivität in Endothelzellen wahrscheinlich limitierend.

4.2.2. Induktion der NAD(P)H-Oxidase durch Angiotensin-II, Endothelin-1 und oxLDL

In weitergehenden Analysen wurde der Einfluß von Ang II, ET-1 und oxLDL auf die NAD(P)H-Oxidase-Expression und -Aktivität in humanen Endothelzellen untersucht. Primärkulturen von humanen Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC) wurden mit Ang II, ET-1 oder oxLDL stimuliert und die mRNA-Expression der in Endothelzellen limitierenden NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit gp91phox und die NAD(P)H-Oxidase-Aktivität durch Cytochrom c-Assay oder Coelenterazin-vermittelte Chemilumineszenz bestimmt.

Ang II (100 µg/ml) induziert die gp91phox-mRNA-Expression 2,6-fach in HUVEC (max. 7 h) (Abb. 34). Diese Induktion ist AT₁-Rezeptor-vermittelt, da sie durch den AT₁-Rezeptor-Blocker Candesartan (1 µM) gehemmt werden kann.

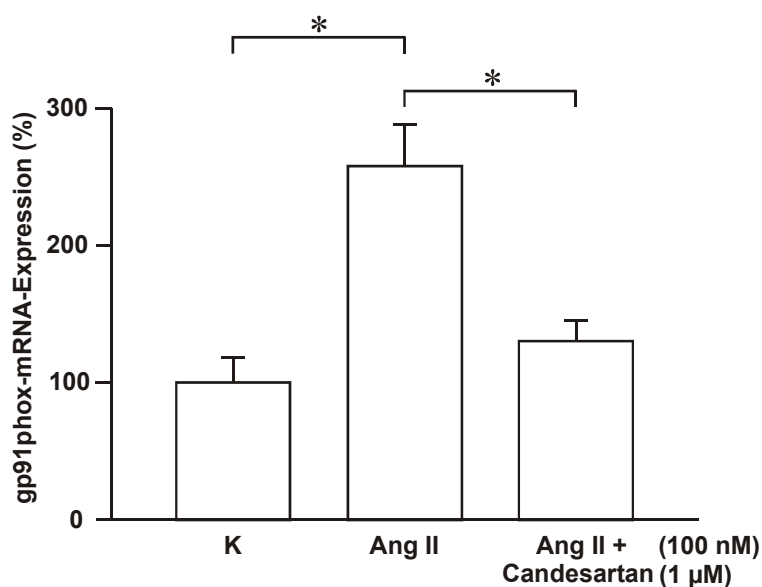


Abb. 34: Induktion der mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit gp91phox durch Ang II in humanen Endothelzellen. HUVEC wurden mit Ang II (100 µg/ml) stimuliert (7 h) und die gp91phox-mRNA-Expression durch standard-kalibrierte kompetitive RT-PCR quantifiziert. Der AT₁-Rezeptor-Blocker Candesartan (1 µM) hemmt die gp91phox-Induktion. Angaben in Prozent der zeitgleichen internen Kontrolle ohne Ang II. *P<0,05.

Eine Behandlung von HUVEC (7 h) mit einer höheren Ang II-Dosis (1 µM) führt dagegen zu einer signifikant niedrigeren gp91phox-mRNA-Expression (Abb. 35). Diese partielle Hemmung der gp91phox-mRNA-Expression ist AT₂-vermittelt, da sie durch Behandlung mit dem AT₂-Rezeptorantagonisten PD123319 aufgehoben werden kann.

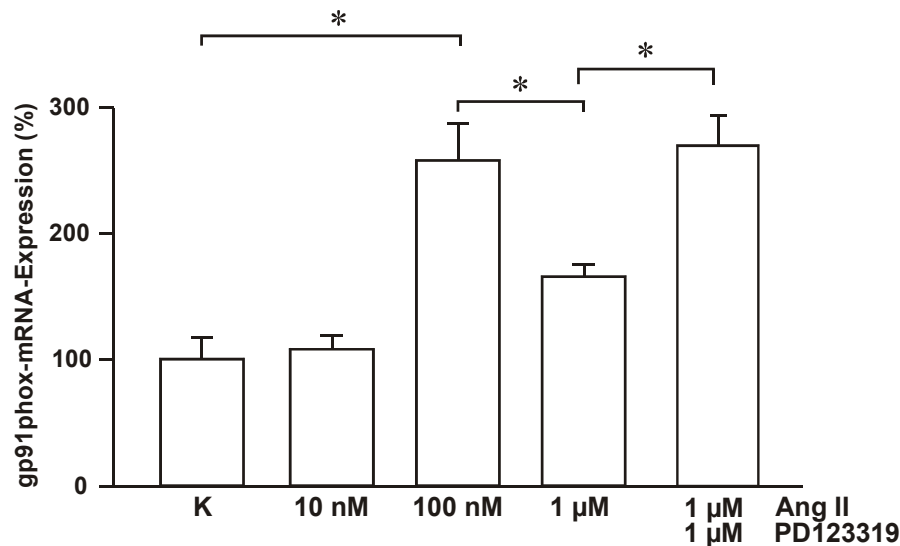


Abb. 35: Dosisabhängige Regulation der mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit gp91phox durch Ang II in humanen Endothelzellen. HUVEC wurden mit Ang II stimuliert (7 h) und die gp91phox-mRNA-Expression durch standard-kalibrierte kompetitive RT-PCR quantifiziert. Der AT₂-Rezeptor-Blocker PD123319 (1 µM) hemmt die partielle Hemmung der gp91phox-Induktion bei 1 µM Ang II. Angaben in Prozent der zeitgleichen internen Kontrolle ohne Ang II. *P<0,05.

Im Gegensatz dazu wird die mRNA-Expression der anderen 3 NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten p47phox, p67phox und p22phox sowohl durch 100 nM, als auch durch 1 µM Ang II ca. 2-fach gesteigert (Abb. 36).

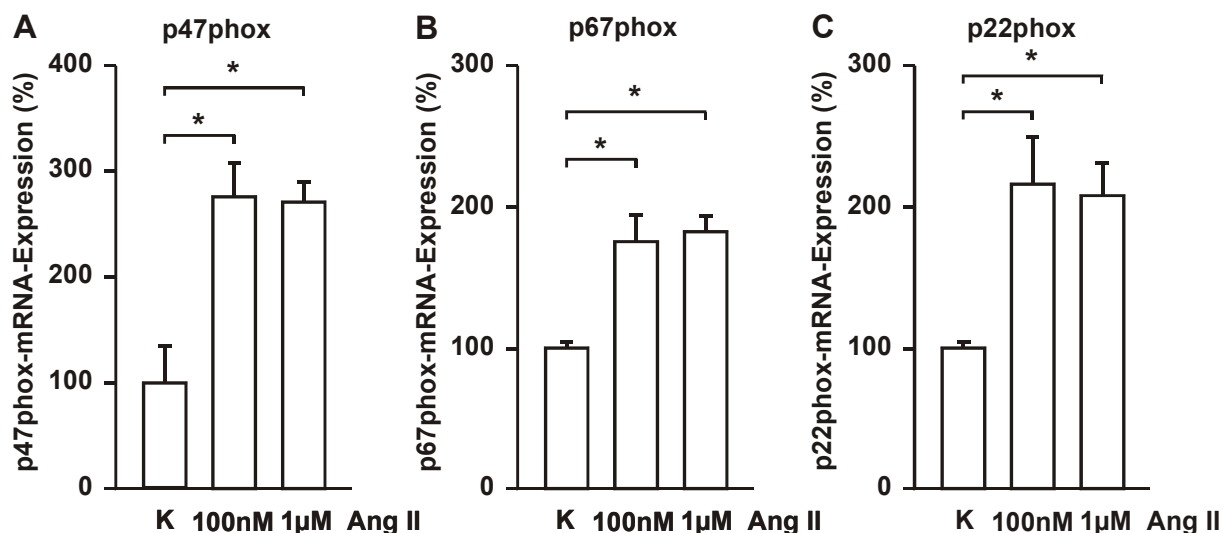


Abb. 36: Dosisabhängige Regulation der mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten p47phox, p67phox und p22phox durch Ang II in humanen Endothelzellen. HUVEC wurden mit Ang II stimuliert (7 h) und die gp91phox-mRNA-Expression durch standard-kalibrierte kompetitive RT-PCR quantifiziert. Angaben in Prozent der zeitgleichen internen Kontrolle ohne Ang II. *P<0,05.

Die DPI-inhibierbare Superoxidanionbildung als Maß der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität wurde durch 100 nM Ang II in HUVEC ebenfalls gesteigert (Abb. 37). Diese erhöhte Superoxidanionbildung nach mehr als 7 h Stimulation mit 100 nM Ang II-konnte durch AT₁-Rezeptorblockade gehemmt werden. Eine höhere Ang II-Dosis (1 µM) führte dagegen in Analogie zur gp91phox-mRNA-Expression zu einer signifikant niedrigeren O₂⁻-Bildung, als nach Stimulation mit 100 nM Ang II. Die dosiabhängige Ang II-stimulierte NAD(P)H-Oxidase-Aktivität korreliert am besten mit der gp91phox-mRNA-Expression ($r=0,97$). Im Gegensatz dazu konnte für die anderen NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten keine vergleichbare Korrelation zwischen mRNA-Expression und Aktivität gezeigt werden (p47phox: $r=0,517$, p67phox: $r=0,415$, p22phox: $r=0,553$).

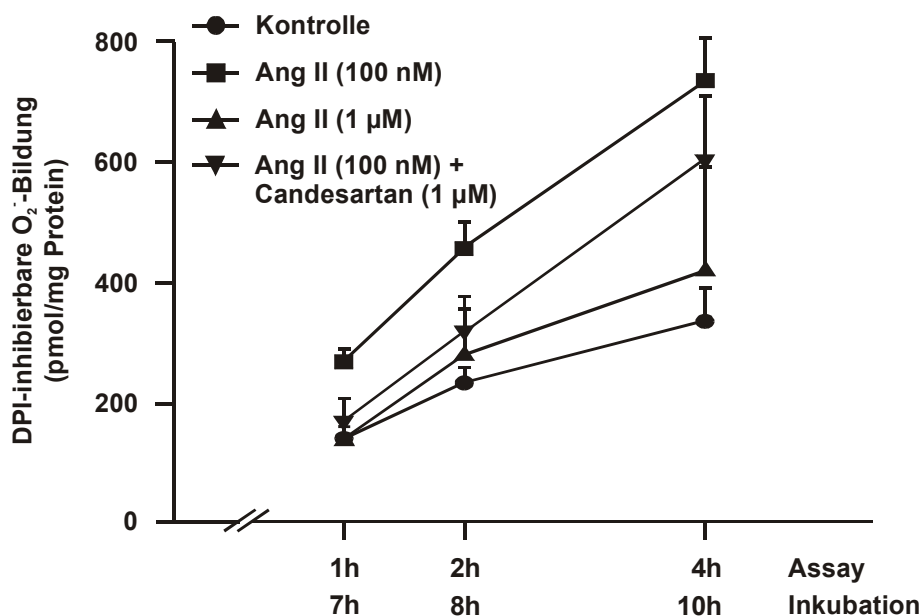


Abb. 37: Dosisabhängige Induktion der Superoxidanionbildung durch Ang II in humanen Endothelzellen. Die NAD(P)H-Oxidase-Aktivität wurde nach Ang II-Inkubation von HUVEC als DPI-inhibierbare Superoxidanionbildung im Cytochrom c-Assay quantifiziert.

Damit konnte eine dosisabhängige Stimulation der mRNA-Expression und Aktivität der NAD(P)H-Oxidase durch Ang II in HUVEC nachgewiesen werden. Die NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit gp91phox limitiert mit hoher Wahrscheinlichkeit die endotheliale NAD(P)H-Oxidase-Aktivität.

In weiterführenden Arbeiten wurde der Einfluß des Vasokonstriktors Endothelin-1 (ET-1) auf die NAD(P)H-Oxidase-Expression und -Aktivität in HUVEC untersucht (Duerrschmidt et al., 2000). ET-1 induziert die gp91phox-mRNA-Expression in HUVEC (Abb. 38). Die maximale Induktion (1,6-fach) der gp91phox-mRNA wurde nach 1 h Stimulation von HUVEC mit 10 nM ET-1 gefunden. Die gp91phox-mRNA-Expression ist transient durch ET-1 induziert und erreicht bereits nach 2 h wieder das basale Expressionsniveau. Die Induktion der mRNA-Expression ist dosisabhängig und erreicht ihr Maximum bei 10 nM ET-1. Der ET_B-Rezeptor-spezifische Inhibitor BQ-788 (1 µM) hat keinen Effekt auf die basale gp91phox-Expression, verhindert aber die ET-1-vermittelte Induktion der limitierenden NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit. Diese Daten sprechen für eine Induktion der NAD(P)H-Oxidase auf mRNA-Ebene durch ET-1 in HUVEC.

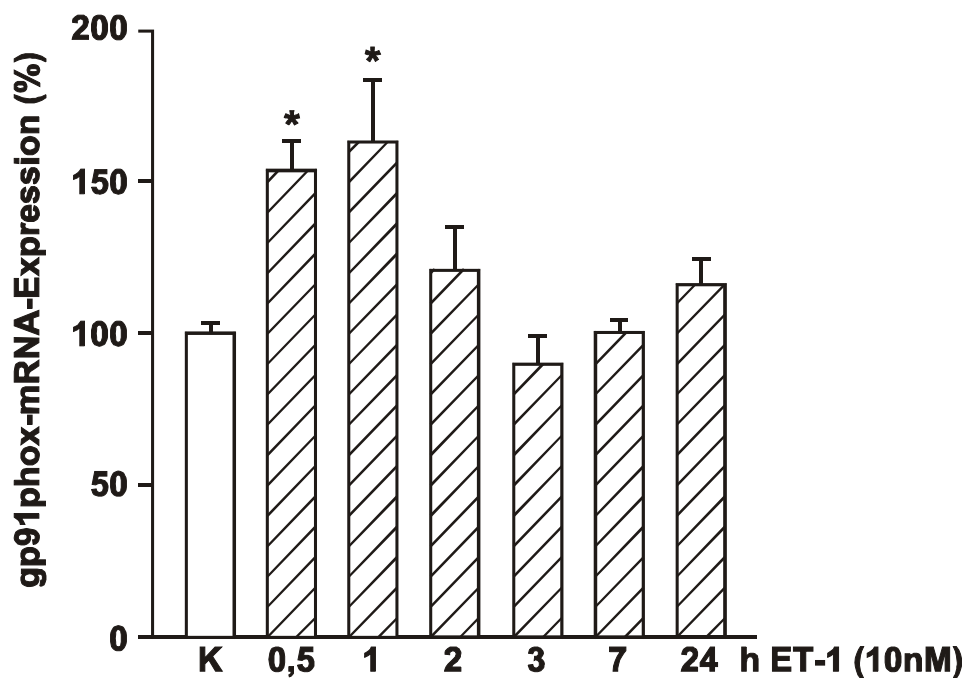


Abb. 38: Zeitabhängige Regulation der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit gp91phox-mRNA-Expression durch ET-1 in humanen Endothelzellen. HUVEC wurden mit ET-1 (10 nM) stimuliert und die gp91phox-mRNA-Expression durch standard-kalibrierte kompetitive RT-PCR quantifiziert. Angaben in Prozent der zeitgleichen internen Kontrolle ohne ET-1, $n \geq 3$, * $P < 0,05$ zu Kontrolle. Kontrolle (K): offener Balken, ET-1: schraffierte Balken.

Um diese mRNA-Daten auf funktioneller Ebene zu unterstützen, wurde die NAD(P)H-Oxidase-Aktivität nach ET-1-Stimulation bestimmt. Dabei wurde die Methode der Coelenterazin-vermittelten Chemilumineszenz als methodische Alternative zum Cytochrom c-Assay und zur Lucigenin-vermittelten Chemilumineszenz etabliert. Das Coelenterazin zeigt im Gegensatz zum Lucigenin keine sich selbst verstärkende Chemilumineszenz durch

Autooxidation. Mit Hilfe des Xanthinoxidase/Xanthin (XO/X)-Systems als Modell wurde darüber hinaus für das Coelenterazin eine weitaus höhere Sensitivität der Superoxidanionmessung als mit Lucigenin gezeigt. Die dabei gemessene Chemilumineszenz konnte durch Superoxid-Dismutase und den Flavinenzym-Inhibitor Diphenyliodoniumchlorid vollständig gehemmt werden. Es handelt sich also bei den mit der Methode gemessenen Werten um Superoxidanionbildung. Stimulation von intakten HUVEC mit ET-1 (10 nM, 90 min) erhöhte signifikant die Superoxidanionbildung (1,4-fach, n=9) (Abb. 39).

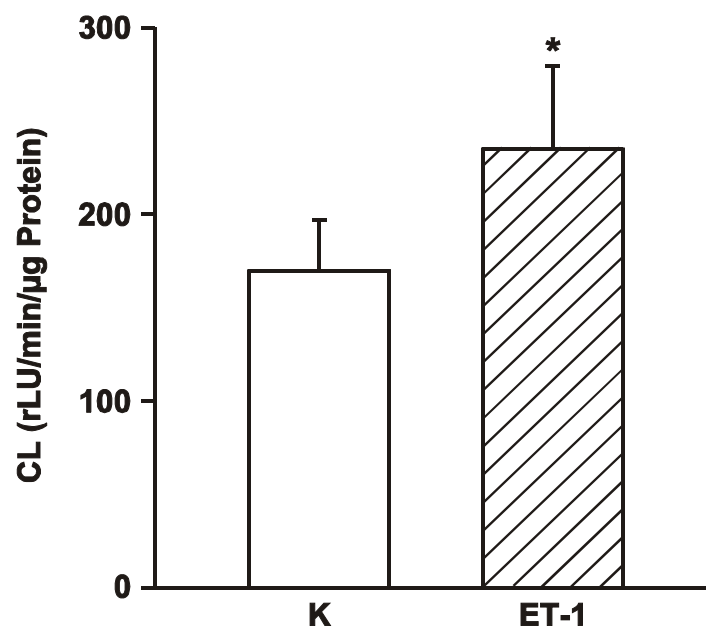


Abb. 39: Induktion der Superoxidanionbildung durch ET-1 in humanen Endothelzellen. Die NAD(P)H-Oxidase-Aktivität wurde nach ET-1-Inkubation (10 nM, 90 min) von HUVEC als Coelenterazin-vermittelte Chemilumineszenz (CL) quantifiziert. Angaben in relative light units (rLU)/min/μg Protein, n=9, *P<0,05 zu Kontrolle. Kontrolle (K): offener Balken, ET-1: schraffierter Balken.

Darüber hinaus wurde der Einfluß von oxLDL auf die NAD(P)H-Oxidase-Expression und die Superoxidanionbildung in HUVEC untersucht (Abb. 40). Die mRNA-Expression der limitierenden NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit gp91phox wurde durch oxLDL induziert (max. nach 1 h, Abb. 40A). Die maximale gp91phox-Induktion wurde mit einer Dosis von 100 μg/ml oxLDL erreicht. Neben dieser erhöhten gp91phox-mRNA-Expression konnte nach oxLDL-Stimulation eine erhöhte DPI-inhibierbare Superoxidanionbildung in HUVEC nachgewiesen werden (Abb. 40B).

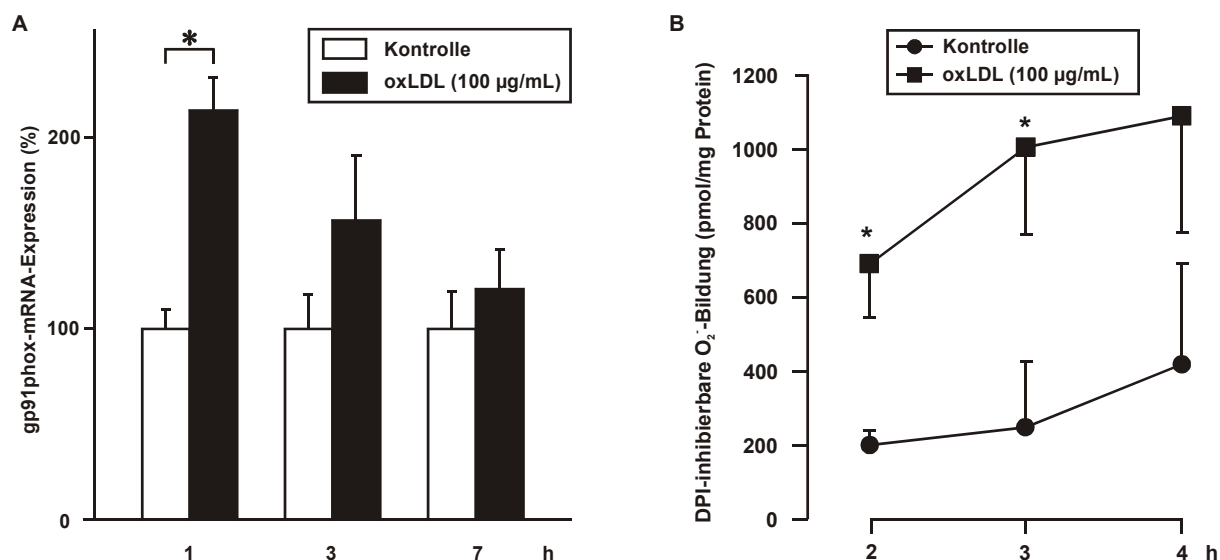


Abb. 40: Induktion von gp91phox-mRNA-Expression und Superoxidanionbildung durch oxLDL in humanen Endothelzellen. Stimulation von HUVEC mit oxLDL (100 µg/ml) führt zu einer Induktion der gp91phox-mRNA (A) nach Quantifizierung durch standard-kalibrierte kompetitive RT-PCR, und der DPI-inhibierbaren Superoxidanionbildung im Cytochrom c-Assay (B) als Maß der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität.

In Zusammenarbeit mit Dr. Sohn und Prof. Pohl (Institut für Physiologie, Ludwig-Maximilians-Universität München) konnte darüber hinaus gezeigt werden, daß Depolarisation eine vermehrte Superoxidanionbildung in humanen Endothelzellen bewirkt (Sohn et al., 2000a). Bei Depolarisation erfolgt die Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase jedoch nicht durch Regulation auf mRNA-Ebene, sondern durch Tyrosinphosphorylierung und anschließende Membrantranslokation des kleinen G-Proteins Rac.

Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, daß Ang II, ET-1 und oxLDL dosisabhängig die mRNA-Expression von NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten und die funktionelle Superoxidanionbildung in humanen Endothelzellen induzieren. Die Ang II-induzierte NAD(P)H-Oxidase-Aktivierung ist AT_1 -Rezeptor-, die ET-1-induzierte Aktivierung ET_B -Rezeptor-vermittelt. Damit konnte ein neues proatherosklerotisches Potenzial von Ang II, ET-1 und oxLDL durch Induktion von oxidativem Streß in humanen Endothelzellen aufgezeigt werden.

4.2.3. Induktion des endothelialen oxLDL-Rezeptors LOX-1 durch Angiotensin-II und ET-1

Nach Stimulation von HUVEC mit Ang II und ET-1 wurde die mRNA-Expression des endothelialen oxLDL-Rezeptors LOX-1 durch standard-kalibrierte kompetitive RT-PCR, die LOX-1-Proteinexpression durch Western-Analysen und die Aufnahme von DiI-markiertem oxLDL quantifiziert (Morawietz et al., 1999b).

Ang II induziert dosisabhängig die LOX-1-mRNA (max. 3-fach, 3 h) in HUVEC (Abb. 41A). Diese LOX-1-Induktion ist AT₁-Rezeptor-vermittelt, da sie durch AT₁-Rezeptorblockade (1 µM Losartan, 100 nM Candesartan) gehemmt werden kann (Abb. 41B). Ang II (100 nM) induziert auch die LOX-1-Proteinexpression (2-fach, 3 h) (Abb. 41C). Eine vergleichbare Erhöhung der funktionellen oxLDL-Aufnahme (2-fach, 3 h) konnte nach Ang II-Stimulation (100 nM) gezeigt werden (Abb. 41D). Die Ang II-stimulierte oxLDL-Aufnahme in HUVEC ist ebenfalls AT₁-vermittelt, da die durch AT₁-Rezeptorantagonisten (1 µM Losartan, 100 nM Candesartan) blockiert werden kann. Eine weitere Inkubation der Endothelzellen mit Ang II führt zu einer vermehrten oxLDL-Aufnahme (max. 6,8-fach, 24 h).

In weitergehenden Experimenten wurde der Einfluß von ET-1 auf die LOX-1-Expression und die oxLDL-Aufnahme in HUVEC untersucht. ET-1 induziert in HUVEC dosisabhängig die LOX-1-mRNA-Expression (max. 1,6-fach, 100 nM ET-1, 1 h) (Abb. 42A). Langfristige Inkubation von HUVEC mit ET-1 (24 h) führt dagegen zu einer Herabregulation der LOX-1-mRNA-Expression. Die LOX-1-Induktion durch ET-1 ist ET_B-Rezeptor-vermittelt. Eine Blockade des ET_B-Rezeptors (1 µM BQ-788) hat keinen Einfluß auf die basale LOX-1-mRNA-Expression, verhindert jedoch die ET-1-vermittelte Induktion von LOX-1 nach 1 h (Abb. 42B). Darüber hinaus wird auch die LOX-1-Proteinexpression durch ET-1 erhöht (max. 1,7-fach, 100 nM ET-1, 1 h) (Abb. 42C). Zusätzlich konnte eine erhöhte oxLDL-Aufnahme in HUVEC nach ET-1-Stimulation (max. 2,2-fach, 100 nM ET-1, 1 h) gezeigt werden (Abb. 42D). Diese erhöhte oxLDL-Aufnahme nach ET-1-Inkubation ist ebenfalls ET_B-Rezeptor-vermittelt.

Damit konnte nach Stimulation mit Ang II und ET-1 eine erhöhte LOX-1-Expression und oxLDL-Aufnahme in HUVEC nachgewiesen werden.

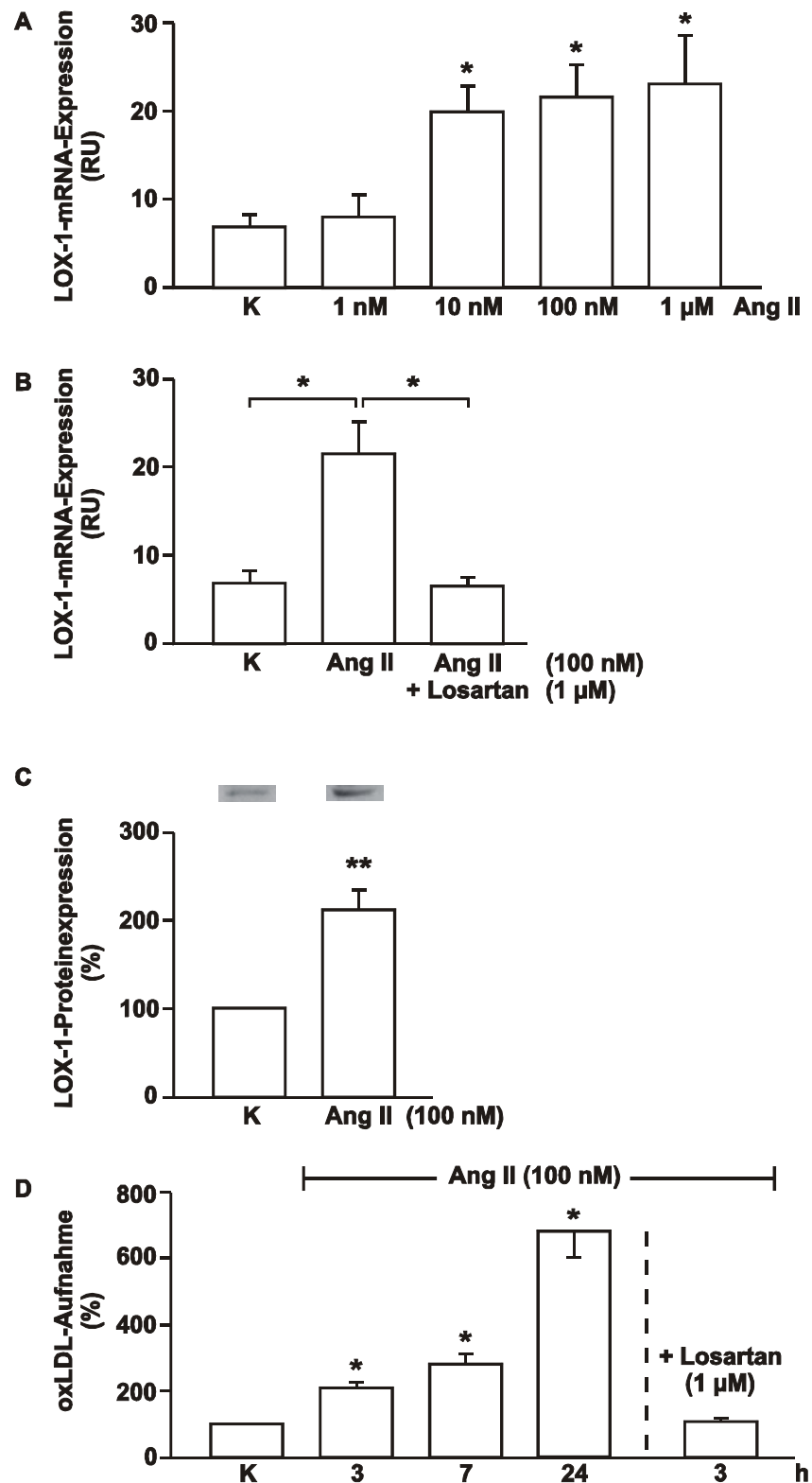


Abb. 41: Angiotensin II induziert LOX-1-Expression und oxLDL-Aufnahme in humanen Endothelzellen. HUVEC wurden für 3 h oder die angegebenen Zeiten mit Ang II stimuliert und die LOX-1-mRNA-Expression durch standard-kalibrierte kompetitive RT-PCR (A, B), die LOX-1-Proteinexpression durch Western-Analysen (C) und die Aufnahme von DiI-markiertem oxLDL (D) quantifiziert. Der AT₁-Rezeptor wurde mit Losartan (1 μ M) blockiert. Angaben in relative units (RU) bzw. Prozent der zeitgleichen Kontrolle ohne Ang II. *P<0,05, **P<0,001.

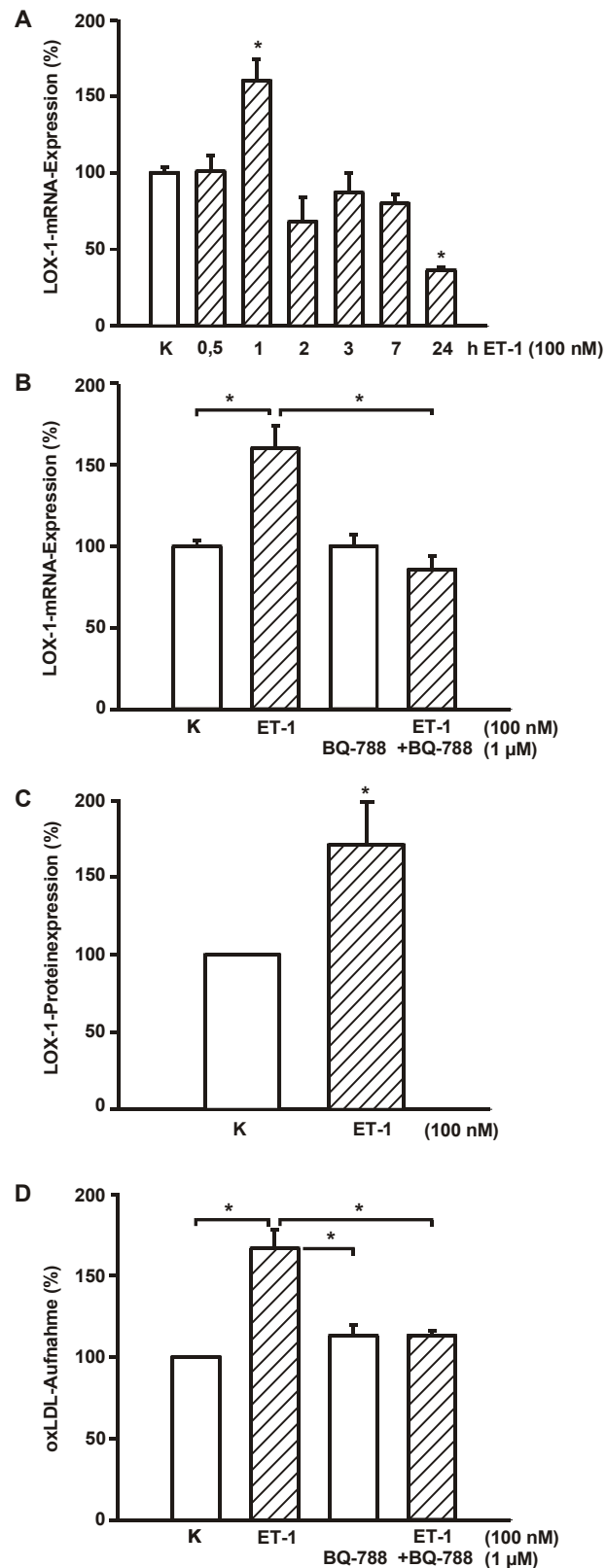


Abb. 42: Induktion von LOX-1-Expression und oxLDL-Aufnahme durch Endothelin-1 in humanen Endothelzellen. HUVEC wurden für 1 h oder die angegebenen Zeiten mit ET-1 (100 nM) stimuliert. Die Quantifizierung der LOX-1-mRNA-Expression (A, B), der LOX-1-Proteinexpression (C) und oxLDL-Aufnahme (D) erfolgte wie in Abb. 41 beschrieben. Der ET_B-Rezeptor wurde mit BQ-788 (1 μ M) blockiert. Angaben in Prozent der zeitgleichen Kontrolle (K) ohne ET-1. *P<0,05. Offene Balken: ohne ET-1, schraffierte Balken: mit ET-1.

4.3. Klinische und tierexperimentelle Untersuchungen

Die im bisherigen Ergebnisteil beschriebenen *in vitro*-Befunde in kultivierten Zellen wurden *in vivo* durch Expressionsuntersuchungen in Biopsien aus tierexperimentellen und klinischen Studien ergänzt und erweitert.

4.3.1. Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit gp91phox und von LOX-1 in arteriellen Biopsien von Patienten mit koronarer Herzkrankheit

Angiotensin II induziert wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben *in vitro* AT₁-vermittelt die mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit gp91phox und des endothelialen oxLDL-Rezeptors LOX-1 in humanen Endothelzellen. Darüber hinaus stimuliert auch oxLDL die gp91phox-mRNA-Expression. Ob Ang II oder oxLDL auch *in vivo* die Expression beider Gene regulieren, wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Zerkowski (Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie der MLU Halle-Wittenberg) in arteriellen Biopsien von Patienten mit koronarer Herzkrankheit untersucht, die sich einer elektiven Bypass-Operation unterzogen (Morawietz et al., 1999b). Die routinemäßig während der Operation anfallenden Biopsien der *Arteria mammaria interna* wurden nach vorheriger Information und Zustimmung der Patienten präpariert, und in der daraus isolierten RNA die gp91phox- bzw. LOX-1-mRNA-Expression durch standard-kalibrierte kompetitive RT-PCR quantifiziert. Die medikamentöse Therapie und die klinischen Charakteristika der Patienten wurden retrospektiv erfaßt.

Zunächst wurde untersucht, ob Reduzierung des Ang II-Spiegels durch medikamentöse ACE-Hemmer-Therapie oder Blockade der Ang II-Wirkung durch Behandlung mit AT₁-Rezeptorantagonisten die gp91phox-mRNA-Expression in *A. mammaria*-Biopsien von Patienten mit koronarer Herzkrankheit beeinflusst. Die Patientenkollektive unterschieden sich nicht in den untersuchten klinischen Parametern (Geschlecht, Alter, Größe, Gewicht, NYHA-Klassifikation, zentraler Venendruck, systolischer und diastolischer Blutdruck, Ejektionsfraktion, Herzfrequenz) oder der Begleitmedikation (AT₁-Blocker, CSE-Hemmer, Ca-Antagonisten, β -Blocker, Diuretika, Nitrate, Herzglykoside oder Antidiabetika). Eine Behandlung mit ACE-Hemmern hatte in den untersuchten Patienten in den verschriebenen Dosierungen keinen Effekt auf die gp91phox-mRNA-Expression. Medikamentöse Behandlung mit einem AT₁-Rezeptorantagonisten führte dagegen zu einer signifikanten Herabregulation der gp91phox-mRNA-Expression im Vergleich zu Patienten ohne AT₁-Blocker- oder mit ACE-Hemmer-Therapie (Abb. 43).

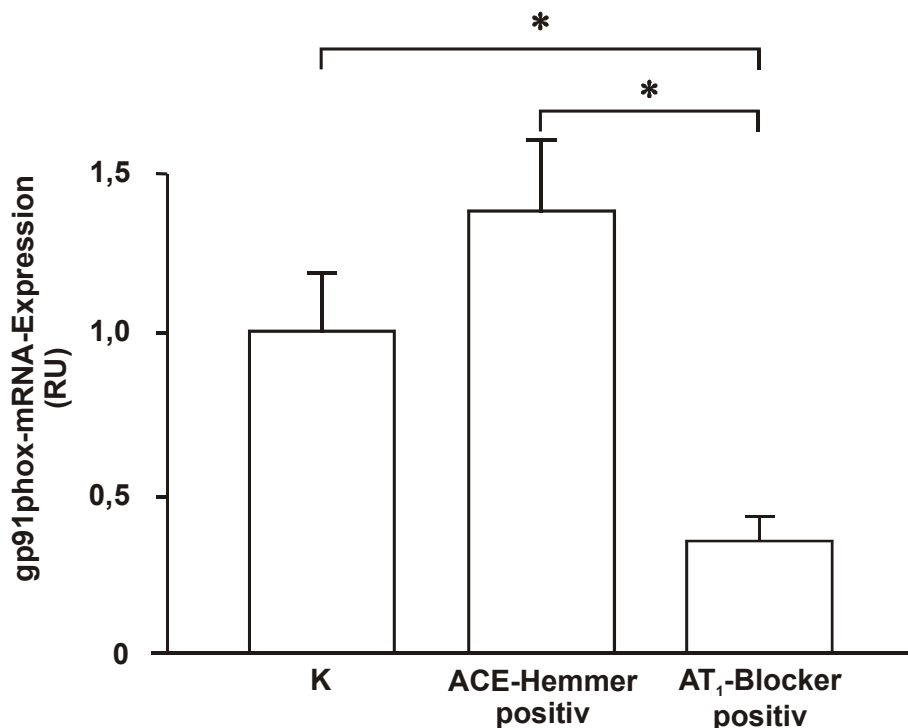


Abb. 43: Herabregulation der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit gp91phox durch medikamentöse Therapie mit AT₁-Rezeptorantagonisten in arteriellen Biopsien von Patienten mit koronarer Herzkrankheit. Die Biopsien der *Arteria mammaria interna* wurden nach vorheriger Information und Zustimmung aus Patienten mit koronarer Herzkrankheit präpariert, die sich einer elektiven Bypass-Operation unterzogen. In der daraus isolierten RNA wurde die gp91phox-mRNA-Expression durch standard-kalibrierte kompetitive RT-PCR in relative units (RU) quantifiziert. *P<0,05.

In vergleichbaren Untersuchungen wurde der Einfluß einer Senkung der körpereigenen Cholesterinsynthese und des LDL-Spiegels durch medikamentöse Cholesterinsyntheseenzym (CSE)-Hemmer-Therapie auf die gp91phox-Expression in arteriellen Biopsien von Patienten mit koronarer Herzkrankheit untersucht. Die Patientenkollektive unterschieden sich nicht in den erfaßten klinischen Parametern (Geschlecht, Alter, Größe, Gewicht, NYHA-Klassifikation, zentraler Venendruck, systolischer und diastolischer Blutdruck, Ejektionsfraktion, Herzfrequenz) oder der Begleitmedikation (ACE-Hemmer, AT₁-Blocker, Ca-Antagonisten, β -Blocker, Diuretika, Nitrate, Herzglykoside oder Antidiabetika) (Tab. 2). Präoperative Behandlung der Patienten mit einem CSE-Hemmer führte zu einer signifikanten Herabregulation der gp91phox-mRNA-Expression. Diese erfolgte unabhängig von einer Therapie mit ACE-Hemmern oder AT₁-Blockern (Abb. 44).

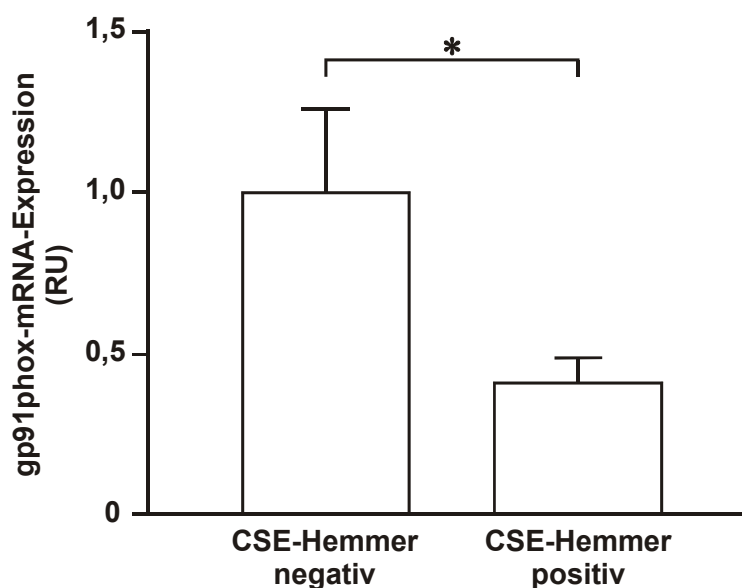


Abb. 44: Präoperative Cholesterinsyntheseenzym (CSE)-Hemmer-Therapie reduziert die Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit gp91phox in arteriellen Biopsien von Patienten mit koronarer Herzkrankheit. Die Biopsien der *Arteria mammaria interna* wurden nach vorheriger Information und Zustimmung aus Patienten mit koronarer Herzkrankheit präpariert, die sich einer elektiven Bypass-Operation unterzogen. In der daraus isolierten RNA wurde die gp91phox-mRNA-Expression durch standard-kalibrierte kompetitive RT-PCR in relative units (RU) quantifiziert. *P<0,05.

In weiteren Untersuchungen wurde der Einfluß einer ACE-Hemmer-Therapie auf die LOX-1-mRNA-Expression in *Arteria mammaria interna*-Biopsien von Patienten mit koronarer Herzkrankheit untersucht (Morawietz et al., 1999b). Die Patientenkollektive unterschieden sich nicht in den untersuchten klinischen Parametern (Geschlecht, Alter, Größe, Gewicht, NYHA-Klassifikation, zentraler Venendruck, systolischer und diastolischer Blutdruck, Ejektionsfraktion, Herzfrequenz) oder der Begleitmedikation (AT₁-Blocker, CSE-Hemmer, Ca-Antagonisten, β -Blocker, Diuretika, Nitrate, Herzglykoside oder Antidiabetika) (Tab. 1). Eine präoperative ACE-Hemmer-Therapie führte zu einer signifikanten Herabregulation der LOX-1-mRNA-Expression im Vergleich zu Patienten ohne ACE-Hemmer-Therapie (Abb. 45).

Damit konnte durch präoperative medikamentöse Therapie eine verringerte gp91phox- (mit AT₁-Rezeptorantagonisten bzw. CSE-Hemmern) bzw. LOX-1-mRNA-Expression (mit ACE-Hemmern) in arteriellen Biopsien von Patienten mit koronarer Herzkrankheit gezeigt werden. Dies spricht für ein antiatherosklerotisches Potenzial dieser primär antihypertensiven und antihypercholesterämischen Therapien.

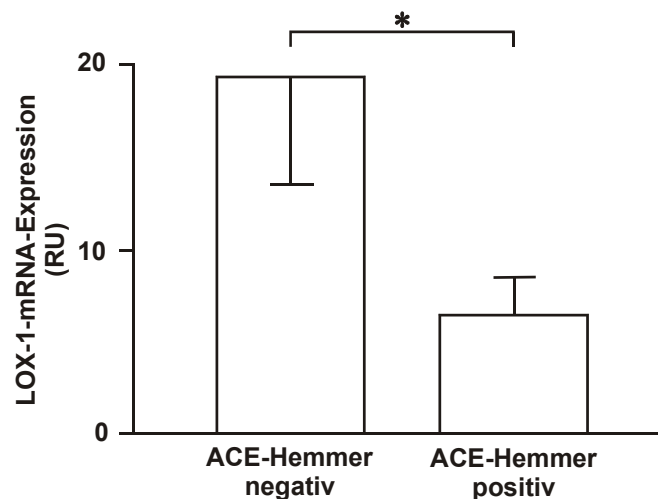


Abb. 45: Herabregulation der Expression des endothelialen oxLDL-Rezeptors LOX-1 durch ACE-Hemmer-Therapie in arteriellen Biopsien von Patienten mit koronarer Herzkrankheit. Die Biopsien der *Arteria mammaria interna* wurden nach vorheriger Information und Zustimmung aus Patienten mit koronarer Herzkrankheit präpariert, die sich einer elektiven Bypass-Operation unterzogen. In der daraus isolierten RNA wurde die LOX-1-mRNA-Expression durch standard-kalibrierte kompetitive RT-PCR in relative units (RU) quantifiziert. * $P < 0,05$.

4.3.2. Wechselwirkungen des Renin-Angiotensin- und des Endothelin-Systems *in vivo*

Die Expression von Genen des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) und des Endothelin-Systems und eine potenzielle Wechselwirkung zwischen beiden Systemen wurde *in vivo* in tierexperimentellen und klinischen Studien untersucht.

4.3.2.1. Tierexperimentelle Untersuchungen

In Zusammenarbeit mit PD Dr. Barton (Kantonsspital Zürich) wurde in C57BL/6J-Mäusen der Einfluß von Übergewicht durch fettreiche Ernährung auf die Expression und Aktivität von Genen des RAS und des ET-Systems in der Niere untersucht (Barton et al., 2000a, b). Übergewicht führt zu einer Erhöhung der ACE-Aktivität und der ET-1-Gewebekonzentration in der Niere. Die Erhöhung der ACE-Aktivität wurde durch zusätzliche Gabe eines ET_A-selektiven Rezeptorantagonisten (LU135252, 50 mg/kg/d) über 30 Wochen verhindert. Die ACE-Herabregulation durch ET_A-Rezeptorblockade erfolgte jedoch nicht auf der Ebene der ACE-mRNA-Expression. Diese Befunde sprechen für ein organprotektives Potenzial selektiver ET_A-Rezeptorblockade in der Niere.

In weiteren Untersuchungen wurden in der Aorta älterer Ratten (24 Monate) im Vergleich zu jüngeren Tieren (3 Monate) für Pre-Pro-Endothelin-1 (1,6-fach), eNOS (2,1-fach) und iNOS (2,5-fach) eine erhöhte mRNA-Expression, sowie eine erhöhte ET-1-Peptid-Konzentration (1,5-fach) nachgewiesen (Goettsch et al., 2001).

4.3.2.2. Expression des ET-Systems in arteriellen Biopsien von Patienten mit koronarer Herzkrankheit

In klinischen Untersuchungen wurde der Einfluß einer ACE-Hemmer-Therapie auf die Expression von Genen des ET-Systems in *Arteria mammaria interna*-Biopsien von Patienten mit koronarer Herzkrankheit untersucht. Eine präoperative ACE-Hemmer-Therapie führte zu einer signifikanten Herabregulation der ECE-1-mRNA-Expression im Vergleich zu Patienten ohne ACE-Hemmer-Therapie (Abb. 46). Die mRNA-Expression von Pre-Pro-Endothelin-1, dem ET_A- und dem ET_B-Rezeptor wurde dagegen durch präoperative ACE-Hemmer-Therapie nicht beeinflusst.

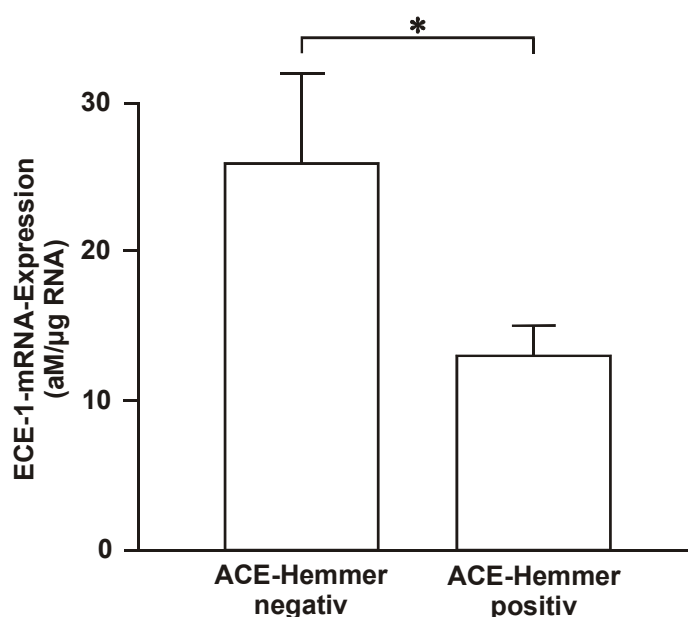


Abb. 46: ACE-Hemmer-Therapie reduziert die ECE-1-mRNA in arteriellen Biopsien von Patienten mit koronarer Herzkrankheit. Die Biopsien der *Arteria mammaria interna* wurden nach vorheriger Information und Zustimmung aus Patienten mit koronarer Herzkrankheit isoliert, die sich einer elektiven Bypass-Operation unterzogen. In der präparierten RNA wurde die ECE-1-mRNA-Expression durch standard-kalibrierte kompetitive RT-PCR quantifiziert. *P<0,05.

Damit konnte in Gefäßen von Patienten mit koronarer Herzkrankheit eine Wechselwirkung zwischen dem RAS und dem ET-System *in vivo* gezeigt werden.

4.3.2.3. Expression des ET-Systems in Myokardgewebe von Patienten mit koronarer Herzkrankheit bzw. Herzinsuffizienz

Die Expression der Gene des Endothelin (ET)-Systems in Abhängigkeit vom Schweregrad der Erkrankung und eine potenzielle Wechselwirkung zwischen dem RAS und dem ET-System wurde in Myokardgewebe von Patienten mit koronarer Herzkrankheit bzw. Herzinsuffizienz untersucht (Morawietz et al., 2000a). Die Biopsien des rechten atrialen Myokards wurden bei Bypass-Operationen in Zusammenarbeit mit Prof. Zerkowski (Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie der MLU), die des linken Ventrikels bei Herztransplantationen bzw. von aus technischen Gründen nicht genutzten Spenderherzen (in Zusammenarbeit mit Prof. Brodde, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der MLU, Prof. Eschenhagen, Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf/Klinische Pharmakologie und Klinische Toxikologie, Universität Erlangen-Nürnberg, und Prof. Zerkowski) zur Verfügung gestellt. Die Quantifizierung der mRNA-Expression erfolgte durch standard-kalibrierte kompetitive RT-PCR, die Messung des ET-1-Peptids durch Radioimmunoassay in Zusammenarbeit mit Dr. Shaw (Universität Bern). Die medikamentöse Therapie und die klinischen Charakteristika der Patienten wurden retrospektiv erfaßt.

Die Ergebnisse zur Quantifizierung der mRNA-Expression der Gene des ET-Systems im rechten atrialen Myokard sind in Tab. 5 zusammengefaßt.

Tab. 5: Expression des ET-Systems im rechten atrialen Myokard von Patienten mit KHK bzw. Herzinsuffizienz.

Gen	NYHA I	NYHA IV	NYHA IV
	ACE-Hemmer negativ (n = 11)	ACE-Hemmer negativ (n = 25)	ACE-Hemmer positiv (n = 16)
Pre-Pro-ET-1, aM/µg	3,7 ± 0,8	3,3 ± 0,4	3,3 ± 0,5
ECE-1, aM/µg	47,5 ± 12,7	98,1 ± 12,5*	66,1 ± 10,0
ET _A , aM/µg	40,0 ± 9,8	37,0 ± 3,9	39,9 ± 5,3
ET _B , aM/µg	58,3 ± 10,7	38,2 ± 3,9*	39,9 ± 4,6

*P<0,05 zu NYHA I.

Im rechten atrialen Myokard wurde die ECE-1-mRNA bei höherem Schweregrad der Erkrankung verstärkt exprimiert (Abb. 47A). Diese ECE-1-Induktion konnte partiell durch ACE-Hemmer-Therapie verhindert werden. Die ET_B-Rezeptor-mRNA wurde dagegen bei schwerer Herzinsuffizienz im rechten Atrium herabreguliert. Die Pre-Pro-ET-1- und ET_A-

Rezeptor-mRNA-Expression wurde im rechten Atrium durch den Schweregrad der Erkrankung oder durch ACE-Hemmer-Therapie nicht beeinflusst.

Im bei Herztransplantationen explantierten linksventrikulären Myokard wird die ECE-1-mRNA im Vergleich zum Spender-Myokard ebenfalls erhöht exprimiert (Abb. 47B). Auch im linken Ventrikel kann diese ECE-1-Induktion partiell durch ACE-Hemmer-Therapie verhindert werden. Eine tendenziell ähnliches Bild ergibt sich nach Messung des ET-1-Peptides, ohne allerdings statistische Signifikanz zu erreichen (Abb. 47C).

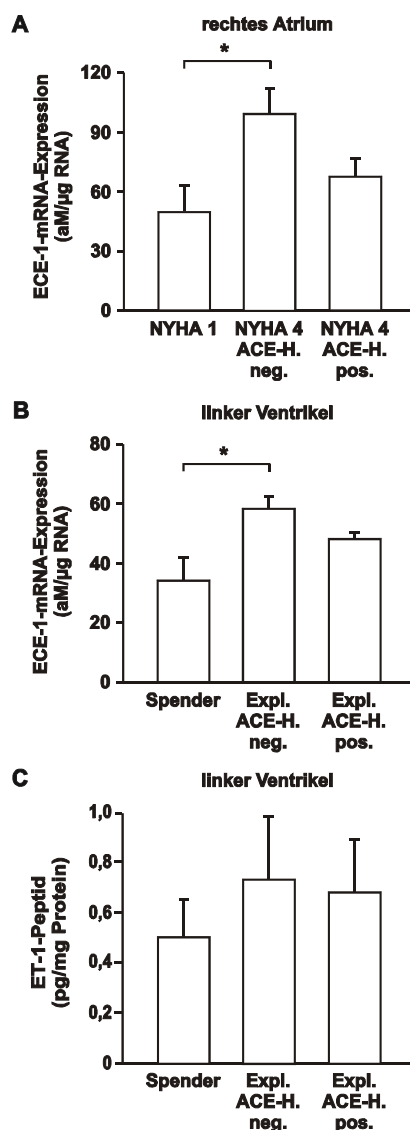


Abb. 47: Induktion der ECE-1-mRNA-Expression im Myokard von Patienten mit Herzinsuffizienz. Die Myokard-Biopsien wurden durch Bypass-Operationen (A) gewonnen oder bei Herztransplantationen (B, C) explantiert (Expl.). Die ECE-1-mRNA wurde durch kompetitive RT-PCR mit RNA des rechten Atriums (A) bzw. des linken Ventrikels (B) von Patienten mit unterschiedlichem Schweregrad der Herzinsuffizienz mit bzw. ohne ACE-Hemmer-Therapie quantifiziert. Das ET-1-Peptid wurde durch Radioimmunoassay im linken Ventrikel gemessen (C). * $P < 0,05$.

Die ET_A-Rezeptor-mRNA-Expression war im linken Ventrikel bei schwerer Herzinsuffizienz erhöht. Eine ACE-Hemmer-Therapie hatte keinen Einfluß auf die ET_A-Expression. Die Pre-Pro-ET-1-mRNA war mit zunehmendem Schweregrad der Herzinsuffizienz tendenziell erniedrigt, ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen. Die ET_B-Rezeptor-mRNA-Expression zeigt keine Unterschiede in Abhängigkeit vom Schweregrad der Erkrankung oder einer ACE-Hemmer-Behandlung (Tab. 6).

Tab. 6: Expression des ET-Systems im linksventrikulären Myokard von Patienten mit Herzinsuffizienz.

Gen	Spender	NYHA IV	
	ACE-Hemmer negativ (n = 7)	ACE-Hemmer negativ (n = 6)	ACE-Hemmer positiv (n = 11)
Pre-Pro-ET-1, aM/μg	5,3 ± 1,1	3,0 ± 0,7	3,4 ± 0,7
ECE-1, aM/μg	34,0 ± 7,0	58,0 ± 4,0*	48,0 ± 2,0
ET _A , aM/μg	12,5 ± 1,4	19,9 ± 2,2*	19,3 ± 3,1
ET _B , aM/μg	17,1 ± 2,2	22,2 ± 3,5	22,8 ± 3,8

*P<0,05 zu Spender.

Damit konnte eine erhöhte ECE-1-mRNA-Expression im Myokard von Patienten mit Herzinsuffizienz gezeigt werde. Die ET-Rezeptoren werden auf mRNA-Ebene kammerpezifisch in Abhängigkeit von Schweregrad der Herzinsuffizienz exprimiert. Während der ET_A-Rezeptor im linken Ventrikel erhöht exprimiert wird, kommt es bei Herzinsuffizienz im rechten Vorhof zu einer erniedrigten ET_B-Rezeptor-mRNA-Expression. Eine Wechselwirkung zwischen dem RAS und dem ET-System im humanen Myokard konnte nach ACE-Hemmer-Therapie auf der Ebene der ECE-1-Expression, jedoch nicht auf ET-Rezeptor-Ebene nachgewiesen werden.

4.3.3. Induktion der endothelialen NO-Synthase durch ACE-Hemmer-Therapie im Myokard von Patienten mit Herzinsuffizienz

Die Expression der eNOS wurde im atrialen und ventrikulären Myokard von Patienten mit Herzinsuffizienz in Abhängigkeit von einer präoperativen ACE-Hemmer-Therapie untersucht. Die Myokard-Biopsien wurden wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben gewonnen. Die mRNA wurde durch standard-kalibrierte kompetitive RT-PCR, die Proteinexpression durch Western-Analyse und die eNOS-Aktivität durch Messung der [³H]-Arginin zu [³H]-Citrullin-

Konversion quantifiziert. Präoperative ACE-Hemmer-Therapie induzierte die atriale eNOS-mRNA-Expression (2,5-fach, Abb. 48A). Die Patientenkollektive unterschieden sich dabei nicht in den untersuchten klinischen Parametern oder der medikamentösen Begleittherapie (Tab. 3). Eine geringere, aber ebenfalls signifikante Erhöhung durch ACE-Hemmer konnte auf Ebene der eNOS-Proteinexpression (Abb. 48B) und der eNOS-Aktivität (48C) gezeigt werden. Die atriale eNOS-mRNA- und Proteinexpression korreliert dabei signifikant.

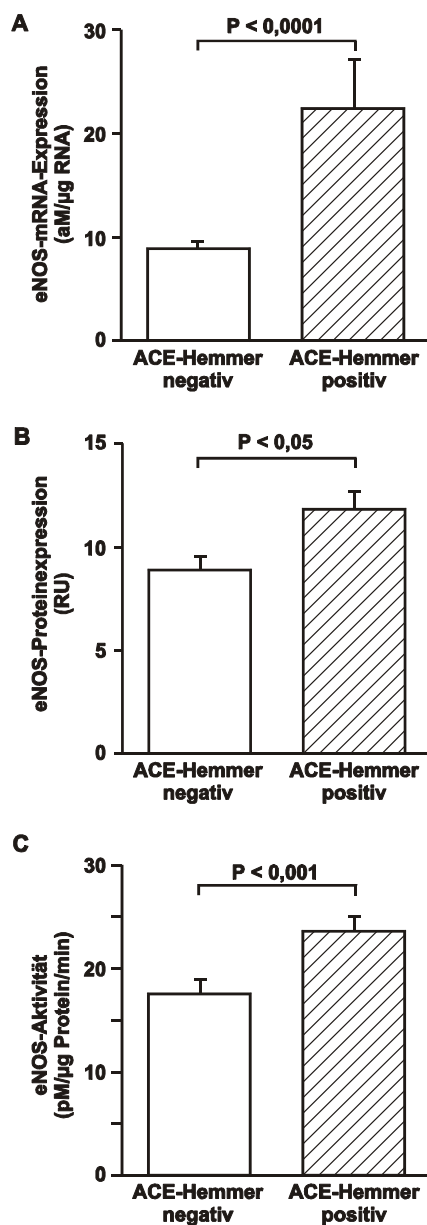


Abb. 48: Induktion der eNOS durch ACE-Hemmer-Therapie im atrialen Myokard von Patienten mit KHK bzw. Herzinsuffizienz. Die Myokard-Biopsien wurden durch Bypass-Operation gewonnen. Die mRNA wurde durch standard-kalibrierte kompetitive RT-PCR (A), die Proteinexpression durch Western-Analyse (B) und die eNOS-Aktivität durch Messung der [3 H]-Arginin zu [3 H]-Citrullin-Konversion (C) quantifiziert.

Darüber hinaus wurde die eNOS-mRNA-Expression im atrialen und ventrikulären Myokard in Abhängigkeit vom Schweregrad der KHK bzw. Herzinsuffizienz untersucht. Im atrialen Myokard von NYHA IV-Patienten ohne ACE-Hemmer-Behandlung war die eNOS-mRNA im Vergleich zu NYHA I-Patienten tendenziell niedriger exprimiert, ohne statistische Signifikanz zu erreichen (Abb. 49A). ACE-Hemmer-Therapie dagegen führte zu einer Induktion der eNOS-mRNA-Expression im atrialen Myokard von NYHA IV-Patienten. Eine ähnliche Regulation der eNOS-Expression konnte im linksventrikulären Myokard von Patienten mit Herzinsuffizienz gezeigt werden (Abb. 49B).

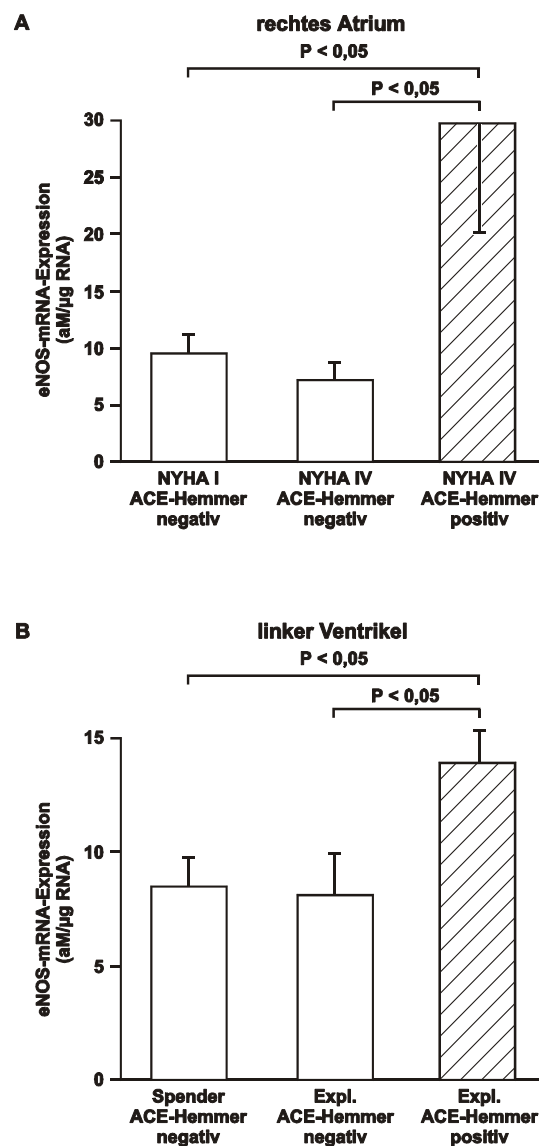


Abb. 49: Einfluß von Schweregrad der Erkrankung und ACE-Hemmer-Therapie auf die eNOS-mRNA-Expression im Myokard von Patienten mit KHK bzw. Herzinsuffizienz. Die Myokard-Biopsien wurden durch Bypass-Operationen (A) gewonnen oder bei Herztransplantationen (B) explantiert (Expl.). Die eNOS-mRNA wurde durch standard-kalibrierte kompetitive RT-PCR in RNA des rechten Atriums (A) bzw. linken Ventrikels (B) gemessen.

Damit konnte eine Induktion der eNOS-Expression im atrialen und ventrikulären Myokard von Patienten mit KHK bzw. Herzinsuffizienz durch ACE-Hemmer-Behandlung nachgewiesen werden. Dieser Mechanismus könnte zum kardioprotektiven Potenzial der ACE-Hemmer und der verbesserten Prognose von Patienten mit KHK bzw. Herzinsuffizienz durch ACE-Hemmer-Therapie beitragen.

4.3.4.Expression des Endothelin-Systems im Myokard von herzinsuffizienten Patienten mit bzw. ohne mechanischer Entlastung durch ventrikuläre Assist-Systeme

Der Einfluß von mechanischer Herzentlastung durch ventrikuläre Assist-Systeme (VAD) auf das ET-System wurde im Myokard von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz während der Überbrückungsperiode bis zur Herztransplantation untersucht (Morawietz et al., 2000a). Die Myokard-Biopsien des linken Ventrikels wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Körfer (Klinik für Thorax- und Kardiovaskularchirurgie, Herz- und Diabeteszentrum NRW, Bad Oeynhausen) bei Im- bzw. Explantation eines ventrikulären Assist-Systems (VAD) gewonnen. Parallel wurden, wie im vorangegangenen Kapitel 4.3.2. beschrieben, linksventrikuläre Proben aus explantierten Herzen (ohne VAD-Entlastung) untersucht.

Da wir eine erhöhte ventrikuläre ET_A-Rezeptor-mRNA-Expression bei terminaler Herzinsuffizienz ($19,9 \pm 2,2$ aM/ μ g RNA) gegenüber Spender-Myokard ($12,5 \pm 1,4$ aM/ μ g RNA, $P < 0,05$) (Abb. 50A) nachweisen konnten, untersuchten wir zunächst die Wirkung von VAD-induzierter Herzentlastung auf die linksventrikuläre ET_A-mRNA-Expression. Die erhöhte ET_A-Expression in diesen terminal herzinsuffizienten Patienten (Pre-VAD: $18,0 \pm 2,0$ aM/ μ g RNA) wurde durch VAD normalisiert (Post-VAD: $12,0 \pm 1,0$ aM/ μ g RNA, $P < 0,05$ zu Pre-VAD) (Abb. 50B). Die ET_A-Expression wurde in 7 der 10 Patienten reduziert, wobei die 3 verbleibenden Patienten bereits initial eine niedrigere ET_A-Expression zeigten. Obwohl durch die mechanische Entlastung die ANP-mRNA-Expression ebenfalls reduziert wurde (Pre-VAD: $180,0 \pm 66,0$ vs Post-VAD: $28,0 \pm 9,0$ aM/ μ g RNA, $P < 0,05$; Spender: $22,0 \pm 12,0$ aM/ μ g RNA), konnte keine Korrelation zwischen ET_A- und ANP-Expression nachgewiesen werden. Auch die Dauer der VAD-Entlastung (von 36 bis 169 Tagen) oder die Expression pro- bzw. antiapoptotischen Gene vor und nach VAD-Entlastung (Bartling et al., 1999) korrelierte nicht mit der ET_A-Expression. Die Pre-Pro-ET-1-, ECE-1- und ET_B-Rezeptor-mRNA-Expression im linksventrikulären Myokard wurde dagegen durch VAD-Entlastung nicht beeinflusst.

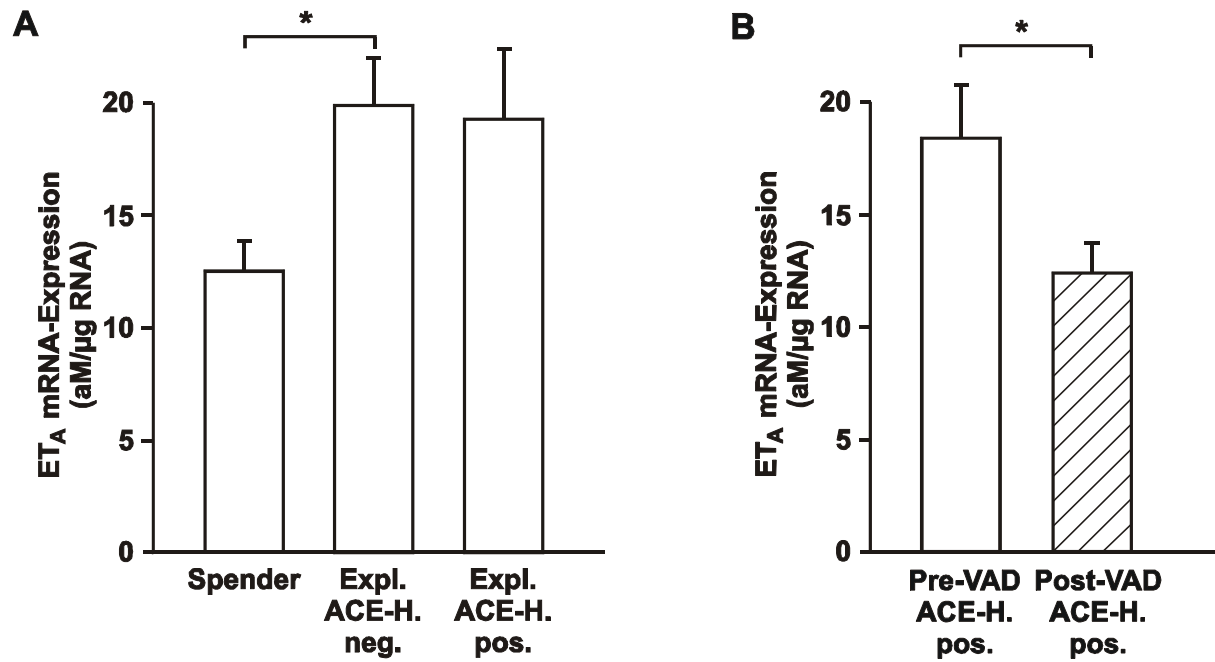


Abb. 50: Normalisierung der erhöhten myokardialen ET_A-mRNA-Expression durch mechanische Entlastung mit ventrikulären Assist-Systemen (VAD) bei Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz. Die linksventrikulären Myokard-Biopsien wurden bei Herztransplantationen mit bzw. ohne präoperativer ACE-Hemmer-Therapie explantiert (Expl.) (A), oder bei Implantation (Pre-VAD) oder Explantation (Post-VAD) eines VAD mit anschließender Herztransplantation gewonnen. Die ET_A-mRNA wurde durch standardkalibrierte kompetitive RT-PCR quantifiziert.

Damit konnte eine Normalisierung der bei Herzinsuffizienz erhöhten linksventrikulären ET_A-Rezeptor-Expression durch mechanische Entlastung mit VAD gezeigt werden. Dies könnte zur Erholung der Myokard-Funktion durch VAD in Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz beitragen (Zerkowski et al., 2000).

5. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war, potenzielle Mechanismen der Ausbildung und Lokalisierung von atherosklerotischen Plaques auf molekularer Ebene zu untersuchen. Es wurden potenziell proatherosklerotische Wirkungen von biomechanischen Kräften (Schubspannung, Dehnung), Angiotensin II (Ang II), Endothelin-1 (ET-1), Apoptose, oxidativem Streß und oxidativ modifiziertem Low-Density-Lipoprotein (oxLDL) in Gefäßzellen untersucht. In tierexperimentellen und klinischen Studien wurde darüber hinaus die Hypothese einer kardioprotektiven Regulation der Genexpression durch ACE- bzw. CSE-Hemmung sowie Angiotensin- bzw. Endothelin-Rezeptorblockade getestet.

5.1. Biomechanische Genexpression in Gefäßzellen

Physiologische laminare Schubspannung stellt einen antiatherosklerotischen Schutzmechanismus dar, der in Endothelzellen eine Vielzahl von strukturellen und funktionellen Veränderungen induziert (Davies et al., 1997; Traub and Berk, 1998). Die Zellen passen ihre Zellform der Strömungsrichtung an, verändern ihre Zelloberfläche, reduzieren die Fibronektin-Expression und zeigen eine verringerte Elastizität (Davies et al., 1997). Diese Veränderungen werden durch eine differenzielle Regulation der Genaktivität mediiert. Um die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen besser verstehen zu können, wurden im ersten Abschnitt dieser Arbeit initial 30 cDNA-Fragmente isoliert, die differenziell durch arterielle oder venöse Schubspannung reguliert werden. Eine allgemeine Abschätzung der Genzahl, die differenziell durch chronische arterielle oder venöse Schubspannung reguliert wird, ist aufgrund dieser Befunde jedoch nicht möglich. Die initial identifizierten RAP-PCR-Fragmente müssen durch Isolierung der korrespondierenden cDNA-Klone verifiziert werden. Die Auflösung der RAP-PCR-Methode erlaubt nur eine Identifizierung von vergleichsweise hoch exprimierten mRNA-Spezies. Daher müßten ergänzend alternative Techniken (z.B. subtraktive Hybridisierung, cDNA-Expression-Array) eingesetzt werden. Darüber hinaus können individuelle RAP-PCR-Fragmente unterschiedliche Bereiche des gleichen cDNA-Klons repräsentieren. Die Arbeiten wurden daher auf das in diesem Ansatz identifizierte Gen mit der stärksten Herabregulation durch arterielle Schubspannung konzentriert.

5.1.1. Molekulare Charakterisierung und schubspannungsabhängige Expression des humanen β -tubulin folding cofactor D

Das Gen mit der in dieser Arbeit stärksten Herabregulation durch arterielle im Vergleich zu venöser Schubspannung wurde als humaner β -tubulin folding cofactor D (tfcD) identifiziert (Schubert et al., 2000).

Das tfcD-Gen des Rindes (Tian et al., 1996) ist in die korrekte Faltung des β -Tubulins involviert. Die Faltung neu synthetisierten β -Tubulins in seine native Konformation ist der erste posttranslationale Schritt in der Bildung des β -Tubulin-Heterodimers aus je einem α - und β -Tubulinpolypeptid. Die korrekte Faltung von α - und β -Tubulin erfordert ein zytosolisches Chaperonin und zusätzliche tubulin folding cofactors (A bis E) (Tian et al., 1999; Cowan and Lewis, 1999) (Abb. 51).

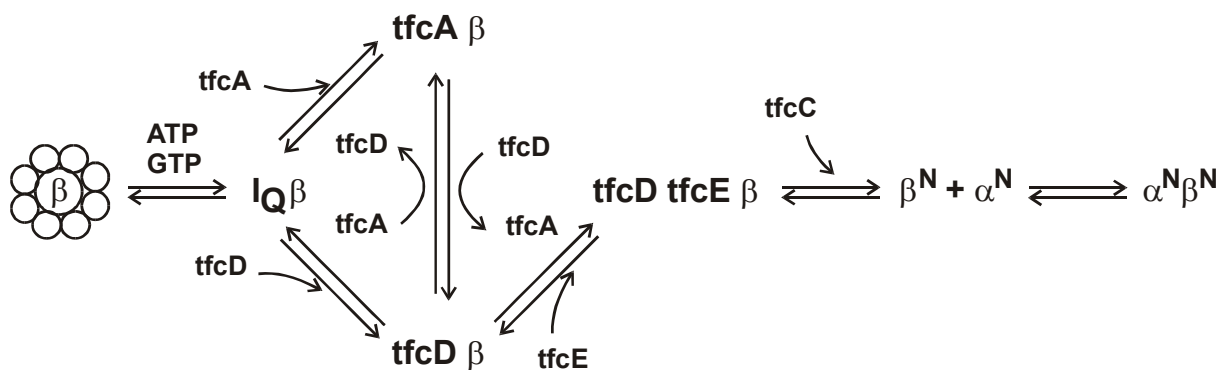


Abb. 51. Schematische Darstellung des β -Tubulinfaltungswegs. Das neu synthetisierte β -Tubulin (β) bindet ATP/GTP-abhängig an ein zytosolisches Chaperonin (I_Q) und wird durch Interaktionen mit weiteren β -tubulin folding cofactors A bis E (tfcA bis tfcE) in eine Konformation gefaltet, die eine Bildung nativer $\alpha\beta$ -Tubulin-Heterodimere ($\alpha^N \beta^N$) ermöglicht (modifiziert nach Tian et al., 1996).

Dieser Tubulin-spezifische Chaperon/tfc-Superkomplex wird als Dimer-Bildungsstruktur angesehen (Tian et al., 1999). Da Tubulin die Mikrotubuli als essentielle Bestandteile des Zytoskeletts bildet, könnte dieser Prozeß die Reorganisation des Zytoskeletts nach Applikation chronischer arterieller Schubspannung in Endothelzellen beeinflussen. Neben seiner Funktion in der β -Tubulin-Faltung kann tfcD nach Abbau nativer $\alpha\beta$ -Tubulin-Heterodimere auch β -Tubulin in tfcD/ β -Tubulin-Komplexen binden (Lewis et al., 1996). Kürzlich wurde für tfcD eine Regulation der mikrotubulären Dynamik durch Dissoziation von β -Tubulin aus GTP-gebundenen $\alpha\beta$ -Tubulin-Heterodimeren beschrieben, die eine Rolle als Mikrotubuli-destabilisierendes Protein vermuten lassen (Martin et al., 2000). Dies wird durch

den zunehmenden Verlust von Mikrotubuli bei tfcD-Überexpression in HeLa-Zellen unterstützt (Martin et al., 2000; Bhamidipati et al., 2000).

Im tfcD-Protein wurden in dieser Arbeit eine Reihe interessanter struktureller Eigenschaften identifiziert. Die identifizierten 2 RGD-Motive, die meist in extrazellulären Matrixproteinen vorkommen, lassen eine Rolle in der Zelladhäsion vermuten (Ruoslahti, 1996). Von den 9 potenziellen Myristoylation-Stellen in der tfcD-Aminosäuresequenz hat wahrscheinlich nur eine N-terminale Stelle eine Funktion *in vivo*. Die potenziellen Phosphorylierungsstellen für die cAMP- und cGMP-abhängigen Proteinkinasen, Tyrosinkinasen, Proteinkinase C und Caseinkinase II stellen Ansatzpunkte für eine mögliche funktionelle Regulation des tfcD-Protein dar. Die funktionelle Relevanz dieser Phosphorylierungsstellen muß jedoch in weiteren Untersuchungen bestätigt werden.

Eine wichtige Rolle der Mikrotubuli bei der schubspannungsabhängigen Reorganisation des Zytoskeletts ist bereits beschrieben worden (Malek and Izumo, 1996). Eine Auflösung des mikrotubulären Netzwerks und eine Hemmung der Tyrosinkinaseaktivität verhinderte die schubspannungsabhängige Ausrichtung der Endothelzellen in Strömungsrichtung und die Ausbildung von Aktin-Streß-Fasern. Diese Daten sprechen für eine dynamische Wechselwirkung zwischen dem mikrotubulären und dem Aktin-Netzwerk bei biomechanischer Belastung (Ingber, 1997). Die Rolle der Mikrotubuli in diesem "Transegrity-Modell" ist eine Stabilisierung des Zytoplasmas und des Nukleus gegen laterale Kompression. Niedrige Schubspannung (z.B. venöse) könnte nur geringfügige Veränderungen im mikrotubulären Netzwerk verursachen, die ein relativ flexibles Zytoskelett zur Folge hat. Höhere Schubspannung (z.B. arterielle) führt dagegen zur Ausbildung von Aktin-Streß-Fasern und einer Reorganisation des mikrotubulären Netzwerkes mit einer erhöhten mechanischen Stabilität des Zytoskeletts. Die wichtige Rolle der Tyrosinkinasen in der schubspannungsabhängigen Reorganisation des Zytoskeletts (Malek and Izumo, 1996) könnte eine Regulation der tfcD-Aktivität an der evolutionär konservierten Tyrosinkinasestelle beinhalten.

In weiteren Experimenten wurden potenzielle Signalwege untersucht, die die Herabregulation der tfcD-Expression durch arterielle Schubspannung vermitteln könnten. Da Applikation von arterieller Schubspannung die endotheliale NO-Synthase (eNOS) und die NO-Bildung als atheroprotektiven Mechanismus induziert (Nishida et al., 1992; Topper et al., 1996; Busse and Fleming, 1998), wurde der Effekt einer Hemmung der eNOS bei Schubspannung sowie einer exogenen NO-Freisetzung bei stationärer Kultur getestet. Die vorliegenden Daten sprechen für eine NO-abhängige Herabregulation der tfcD-Expression.

Die Herabregulation der *tfcD*-Expression durch arterielle Schubspannung war deutlich stärker als nach exogener NO-Freisetzung mit DETA-NO. Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied könnte die Notwendigkeit einer langanhaltenden, kontinuierlichen NO-Freisetzung für eine deutliche Herabregulation der *tfcD*-Expression sein. Obwohl DETA-NO als ein NO-Donor mit langanhaltender NO-Freisetzung gilt, könnte während der 24 h-Inkubation in Medium mit 5% Dextran die NO-Freisetzung geringer werden. Im Gegensatz dazu ist hohe laminare Schubspannung einer der stärksten physiologischen Stimuli für die kontinuierlich erhöhte eNOS-Expression und NO-Bildung (Busse and Fleming, 1998). Dies könnte die geringere Herabregulation der *tfcD*-Expression durch die exogene NO-Gabe erklären. Darüber hinaus aktiviert Schubspannung auch NO-unabhängige Signalwege und die Freisetzung weiterer endothelialer Mediatoren.

NO kann die Expression anderer Gene durch cGMP-abhängige Aktivierung oder Inaktivierung von Transkriptionsfaktoren regulieren (Förstermann et al., 1998). Eine Reihe pathophysiologisch relevanter Gene werden durch NO in Endothelzellen gehemmt, z.B. MCP-1 (Tsao et al., 1997; Bao et al., 1999), ICAM-1 (Khan et al., 1996), VCAM-1 (Khan et al., 1996; De Caterina et al., 1995) bzw. PDGF-A (Bao et al., 1999). Ein potenzieller Mechanismus einer NO-abhängigen Regulation von Transkriptionsfaktoren ist die Hemmung der NF- κ B-Aktivität durch Induktion und Stabilisierung des NF- κ B-Inhibitors I κ B α in humanen Endothelzellen (Peng et al., 1995). Chronische arterielle Schubspannung reduziert die NF- κ B-Aktivität in humanen Endothelzellen (Mohan et al., 1997). Dies wurde durch eigene unveröffentlichte Daten bestätigt. Darüber hinaus reguliert eine schubspannungsabhängige NO-Freisetzung die NF- κ B-Inhibition in HUVEC (Tsao et al., 1996).

Eine Auflösung des mikrotubulären Netzwerks verhindert seinerseits die flußabhängige NO-Freisetzung in perfundierten Gefäßen (Hutcheson and Griffith, 1996). Die in dieser Arbeit beschriebenen Daten sprechen für einen zusätzlichen Signalweg in die entgegengesetzte Richtung durch NO-abhängige Regulation der β -Tubulinfaltung und des mikrotubulären "turnover".

Das intrazelluläre Verteilungsmuster des *tfcD*-Proteins spricht für eine Kolokalisation mit β -Tubulin. Dies konnte in dieser Arbeit durch immunhistologische Doppelfärbung bestätigt werden. Eine ähnliche Kolokalisation mit β -Tubulin wurde auch für das *tfcD*-Homolog aus Hefe beschrieben (Hirata et al., 1998).

In Zusammenfassung zeigen unsere Daten eine NO-abhängige Herabregulation des *tfcD*-Gens durch arterielle laminare Schubspannung in humanen Endothelzellen. Das *tfcD*-Gen

könnte in die Regulation der mikrotubulären Dynamik in Abhängigkeit vom Grad der Schubspannung involviert sein. Der höhere Grad von Schubspannung in arteriellen Gefäßen reduziert das Mikrotubuli-destabilisierende tfcD-Protein in Endothelzellen und erhöht die mechanische Stabilität im Vergleich zu venösen Endothelzellen. Dieser Wechsel in der mikrotubulären Dynamik scheint NO-abhängig zu sein. Daher sprechen diese Daten für eine neue Rolle von NO als Signalmolekül, das die Wirkung mechanische Kräfte in funktionelle Veränderungen des mikrotubulären Netzwerks in humanen Endothelzellen überträgt.

Das tfcD-Protein steht in Rinderzellen im Gleichgewicht mit einem tfcA-Protein (Abb. 51) (Tian et al., 1996). Die starke Homologie des daraufhin in dieser Arbeit klonierten humanen tfcA von mehr als 90% mit verwandten Proteinen aus Maus bzw. Rind zeigt die hohe evolutionäre Konservierung der Proteine, die in die β -Tubulinfaltung involviert sind. Die gezeigte Herabregulation der tfcA-, tfcE- und β -Tubulin-mRNA spricht für verringerte β -Tubulinneusynthese und -faltung bei hoher laminarer Schubspannung.

5.1.2. Regulation des Endothelin-Systems durch Schubspannung

In der vorliegenden Arbeit wurde die schubspannungsabhängige Regulation von Genen untersucht, die in der Pathogenese der Atherosklerose eine Rolle spielen könnten. Dabei wurde zunächst die Regulation des Endothelin-Systems durch laminare Schubspannung in humanen Endothelzellen analysiert (Morawietz et al., 2000b). Applikation chronischer laminarer Schubspannung führt dabei zu einer dosisabhängigen Herabregulation der ET-1-Synthese. Die dosisabhängige Herabregulation der PPET-1-mRNA in dieser Arbeit ist in Übereinstimmung mit früheren Befunden in Rinder-Endothelzellen (Malek and Izumo, 1992). In humanen Endothelzellen wurde eine Herabregulation der PPET-1-mRNA nach PCR-Amplifikation und anschließendem Nachweis durch Southern-Analyse gezeigt (Sharefkin et al., 1991). Mit Hilfe der standard-kalibrierten kompetitiven RT-PCR konnte in der vorliegenden Arbeit eine dosisabhängige Herabregulation der PPET-1-mRNA durch Schubspannung quantifiziert werden. Nach Applikation von 15 dyn/cm^2 wurde eine vergleichbare Herabregulation in Rinder-Endothelzellen gefunden (Malek and Izumo, 1992). Im Gegensatz zu den beschriebenen Northern-Daten in Rinderzellen konnten wir eine weitere PPET-1-Herabregulation bei 30 dyn/cm^2 nachweisen. Dies könnte ein Hinweis auf eine speziesspezifische Regulation sein.

Zusätzlich wurde eine Herabregulation der endothelialen ECE-1-mRNA und der ET-1-Peptid-Freisetzung durch laminare Schubspannung gezeigt. Diese Daten weisen daraufhin, daß Endothelzellen die ET-Freisetzung auf unterschiedlichen Ebenen regulieren können.

Arterielle Schubspannung reguliert die vorherrschende ECE-1-Isoform ECE-1a und die ET-1-Freisetzung in vergleichbarer Größenordnung herab. Dies ist in Übereinstimmung mit der Promotorstruktur beider Isoformen, wonach ECE-1a als die stärker transkriptionell regulierte Isoform im Vergleich zur eher konstitutiv exprimierten Isoform ECE-1b angesehen wird (Valdenaire et al., 1995; Orzechowski et al., 1997). ECE-1-Immunreaktivität ist in HUVEC und arteriellen Koronarendothelzellen auf der Zelloberfläche in luminaler Richtung nachgewiesen worden (Russell et al., 1998). Ein Teil der enzymatischen ECE-1-Aktivität ist somit in Richtung des Blutstroms gerichtet und selbst Schubspannung *in vivo* ausgesetzt. Eine attraktive Hypothese ist daher, daß ECE-1 zirkulierendes Big-ET-1 schubspannungsabhängig prozessiert. Auf diese Weise könnten sich die Endothelzellen an flußabhängige Veränderungen durch Regulation der ET-1-Synthese anpassen.

Die Herabregulation der PPET-1-mRNA ist in unseren Untersuchungen nicht PKC-abhängig. Dies ist in Übereinstimmung mit Experimenten in Rinder-Endothelzellen, in denen arterielle Schubspannung keine PKC-Translokation oder -Aktivität induzieren konnte (Malek et al., 1993). Arterielle Schubspannung induziert die Synthese und Bildung von NO (Uematsu et al., 1995; Busse and Fleming, 1998). Daneben wird die ET-Freisetzung aus der Schweine-Aorta durch NO verhindert (Boulanger and Luscher, 1990). Die flußabhängige Herabregulation der ET-1-Peptid-Freisetzung erfolgt NO-abhängig (Kuchan and Frangos, 1993). Wir haben die Arbeiten von Kuchan und Frangos auf mRNA-Ebene weitergeführt und fanden eine ähnliche NO-abhängige Hemmung der schubspannungsabhängigen Herabregulation der PPET-1-mRNA in HUVEC. Die schubspannungsabhängige Reduktion der ET-Freisetzung war ebenfalls partiell durch hohe NO-Inhibitorkonzentrationen gehemmt, ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Diese Daten weisen daraufhin, daß NO in die Herabregulation der ET-1-Synthese auf mRNA-Ebene involviert ist. Es scheinen dabei auch weitere, NO-unabhängige Signalwege eine Rolle zu spielen.

Überraschenderweise wird der auf Endothelzellen dominierende Endothelin-Rezeptor B (ET_B) dosisabhängig durch laminare Schubspannung induziert. Dies ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung, daß der ET_B-Rezeptor variabel in Primärkulturen von humanen Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC), jedoch auf hohem Niveau in Rinder-Aorta-Endothelzellen exprimiert wird, die vorher *in vivo* hoher Schubspannung ausgesetzt waren (Ogawa et al., 1991). Eine ähnliche Induktion von ET_B-Bindungsstellen wurde in VSMC aus Arterien des Hundes durch chronische Steigerung des Blutflusses beobachtet (Barber et al., 1996). Eine inverse Regulation von ET-1 und ET_B-Rezeptor wurde in anderen Zelltypen beschrieben. Erhöhte ET-1-Spiegel führen zu einer Senkung der ET_B-mRNA (Asada et al.,

1995). Die schubspannungsabhängige Herabregulation der ET-1-Peptidsynthese und die parallele Induktion des ET_B-Rezeptors könnte ein gegenläufiger Mechanismus sein. Unsere pharmakologischen Studien zeigten jedoch, daß die ET_B-Induktion PKC-abhängig ist, während die Herabregulation der PPET-1-mRNA und der ET-Peptidfreisetzung nicht durch PKC vermittelt wird. Daher sind in die ET_B-Induktion durch Schubspannung wahrscheinlich zusätzliche PKC-abhängige Signalwege involviert.

Der endotheliale ET_B-Rezeptor vermittelt NO-Freisetzung (Boulanger and Luscher, 1990) und ET-1-abhängiges "cell survival" (Shichiri et al., 1997). Darüber hinaus ist für den ET_B-Rezeptor eine Rolle als "clearance receptor" beschrieben worden. Eine schubspannungsabhängige Induktion des ET_B-Rezeptors könnte so einen antiatherosklerotischen Schutzmechanismus durch verstärkte Bindung und Abbau von zirkulierendem ET-1 darstellen. Erhöhte ET-1-Plasmaspiegel und erhöhte ET-1-Immunreaktivität in der Gefäßwand korrelieren mit dem Ausmaß koronarer endothelialer Dysfunktion und Atherosklerose (Lerman et al., 1991; Lerman et al., 1995; Barton et al., 1998). Erhöhte ET-1-Serumspiegel können durch verstärkte Freisetzung ("spill-over") aus den Gefäßen erklärt werden (Ando et al., 1989). Aufgrund unserer Daten kann eine lokal erhöhte ET-1-Konzentration in der Frühphase der Atherosklerose auch durch lokal verringerte oder nicht-laminare Schubspannung (z.B. an Gefäßverzweigungen, die als Prädispositionsstellen für atherosklerotische Plaques beschrieben wurden) (Glagov et al., 1988) verursacht sein. Lokal erhöhte ET-1-Konzentrationen können eine Reihe proatherosklerotischer Mechanismen verstärken. Dazu zählt die autokrin/parakrine Stimulation der Proliferation glatter Muskelzellen, die zur Neointimabildung führen kann (Komuro et al., 1988). Damit kann der ET_B-Rezeptor antiatherosklerotische Mechanismen in einer schubspannungsabhängigen Weise vermitteln. Diese Daten unterstützen in der aktuellen Diskussion die Nutzung selektiven ET-Rezeptor-Blocker (Packer et al., 1998; Webb et al., 1998).

Zusammenfassend kann die gezeigte Herabregulation der ET-1-Bildung zum vasoprotektiven und antiatherosklerotischen Potenzial hoher laminarer Schubspannung beitragen. Die Induktion des NO-freisetzenden ET_B-Rezeptors ist ein weiterer antiatherosklerotischer Effekt arterieller laminarer Schubspannung.

5.1.3. Schubspannungsabhängige Expression von pro- bzw. antiapoptotischen Genen

In weitergehenden Studien wurde in dieser Arbeit gezeigt, daß chronische Applikation arterieller Schubspannung die Apoptoserate in kultivierten humanen Endothelzellen reduziert

(Bartling et al., 2000). Diese Daten bestätigen frühere Untersuchungen, die eine Reduktion der endothelialen Apoptose durch Schubspannung beschreiben (Dimmeler et al., 1996; Kaiser et al., 1997). Die schubspannungsabhängige Reduktion der Apoptose war in unseren Untersuchungen mit einer verringerten Expression des proapoptotischen Fas-Rezeptors und einer erhöhten Bildung des antiapoptotischen Bcl-x_L und der Fas-Isoform FasExo6Del verbunden. Der Fas-Rezeptor und sein Ligand FasL sind in humanen Endothelzellen exprimiert (Sata et al., 2000). Obwohl Endothelzellen *in vitro* nach Fas-Rezeptor-Aktivierung in der Regel resistent gegen die Induktion des apoptotischen Zelltodes sind (Richardson et al., 1994; Sata et al., 2000), können proatherosklerotische Faktoren wie oxLDL (Sata and Walsh, 1998) oder oxidativer Streß durch Wasserstoffperoxid (Suhara et al., 1998) Endothelzellen für einen Fas-vermittelten Apoptoseweg sensibilisieren. Zusätzlich konnte erhöhte Fas-Expression und Apoptose immunhistochemisch vorrangig in Endothelzellen arterieller Gewebe mit Atherosklerose nachgewiesen werden (Dong et al., 1996). Diese Daten weisen auf eine potenzielle Rolle des Fas-Rezeptorweges in der endothelialen Apoptose und in der Pathogenese der Atherosklerose hin. Im Gegensatz zu Fas könnte die erhöhte Expression des antiapoptotischen Bcl-x_L durch arterielle Schubspannung in die Kontrolle der Vitalität der Endothelzellen auch ohne proapoptotische bzw. proatherosklerotische Sensibilisierung durch Faktoren wie z.B. TNF- α involviert sein (Ackermann et al., 1999).

Darüber hinaus konnten wir die Induktion des antiapoptotischen Mcl-1 durch hohe Schubspannung zeigen, während die Expression des antiapoptotischen Bcl-2 unverändert blieb. Überraschenderweise wird auch die Bak-Expression durch arterielle Schubspannung induziert. Bak ist als ein Apoptose-induzierendes Protein der Bcl-2-Familie beschrieben worden, das die Bcl-x_L-Funktion durch Heterodimer-Bildung hemmen kann (Chittenden et al., 1995; Farrow et al., 1995). Die Daten einer Rolle von Bak als pro- oder antiapoptotischer Stimulus sind widersprüchlich. Bak-Überexpression bewirkt sowohl pro-, als auch antiapoptotische Effekte (Kiefer et al., 1995). Darüber hinaus ist in linksventrikulärem Myokardgewebe von Patienten mit Herzinsuffizienz die Bak-mRNA- und Proteinexpression verringert, obwohl die myokardiale Apoptose erhöht ist (Bartling et al., 1999). Die erhöhte Bak-Expression durch laminare Schubspannung könnte jedoch auch ein kompetitiver Effekt der schubspannungsabhängigen Induktion seines antiapoptotischen Heterodimerisierungspartners Bcl-x_L sein (Farrow et al., 1995; Sattler et al., 1997).

Atherosklerotische Läsionen entwickeln sich präferenziell in Regionen mit verringerter Schubspannung oder Strömungsumkehr (Glagov et al., 1988; Traub and Berk, 1998). Diese Regionen sind durch einen erhöhten endothelialen "turnover" gekennzeichnet (Caplan and

Schwartz, 1973), der teilweise durch erhöhte Apoptose vermittelt sein kann. Im Gegensatz zu hoher arterieller Schubspannung konnte in unseren Untersuchungen niedrige Schubspannung die Apoptoserate in HUVEC nicht senken. Ähnliche Befunde wurden nach Induktion der endothelialen Apoptose durch Wachstumsfaktorentzug oder TNF- α -Stimulation beschrieben (Dimmeler et al., 1996). Ein möglicher Mechanismus könnte die ausschließliche Induktion der antiapoptotischen FasExo6Del und Bcl-x_L durch hohe Schubspannung sein. Darüber hinaus verringert niedrige Schubspannung die Expression des antiapoptotischen Bcl-2. Diese Daten sprechen für eine erhöhte Apoptosesensitivität in Gefäßbereichen mit niedriger im Vergleich zu hoher laminarer Schubspannung.

Die schubspannungsabhängige NO-Freisetzung (Busse and Fleming, 1998) scheint in das antiapoptotische Potenzial von laminarer Schubspannung involviert zu sein (Dimmeler et al., 1997b). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluß einer Hemmung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) auf die Expression pro- bzw. antiapoptotischer Gene bei statischer Kultur oder bei Schubspannung untersucht. Die Hemmung der eNOS verringerte die basale Expression der antiapoptotischen Bcl-x_L und Bcl-2. Zusätzlich ist die schubspannungsabhängige Induktion von Bcl-x_L und Bak NO-vermittelt. Unsere Daten bestätigen damit frühere Untersuchungen, die für eine Mitwirkung von NO an der verringerten Caspase-Aktivierung und Kern-Apoptose in Endothelzellen sprechen (Hermann et al., 1997; Dimmeler et al., 1997b).

In Zusammenfassung schützt hohe laminare Schubspannung Endothelzellen vorrangig durch Bcl-x_L- und FasExo6Del/Fas-Signalwege vor dem apoptotischen Zelltod. Der protektive antiapoptotische Effekt von hoher laminarer Schubspannung wird teilweise durch endotheliale NO-Freisetzung vermittelt.

5.1.4. Regulation der Transkriptionsfaktoren Egr-1 und AP-1 durch biomechanische Kräfte

Die in dieser Arbeit beschriebene Induktion des Transkriptionsfaktors Egr-1 durch Schubspannung wurde kürzlich auch von anderen Arbeitsgruppen in Endothelzellen nachgewiesen (Khachigian et al., 1997; Schwachtgen et al., 1998; Bao et al., 1999). Die Induktion von Egr-1 durch Schubspannung wurde durch Hemmung der eNOS potenziert. Dies bestätigt eine kürzliche Arbeit, die eine Hemmung der schubspannungsabhängigen Egr-1-Induktion durch NO-Freisetzung über einen ERK-abhängigen Signalweg beschreibt (Chiu et al., 1999).

AP-1 wird in dieser Arbeit in HUVEC durch Schubspannung transient induziert. Dies bestätigt frühere Arbeiten in Rinder-Endothelzellen (Lan et al., 1994). Diese Induktion könnte eine Streßantwort der zuvor stationär kultivierten Endothelzellen darstellen. Das AP-1-bindende "TPA-responsive element" ist in die schubspannungsabhängige Induktion des MCP-1-Gens involviert (Shyy et al., 1995). Chronische arterielle Schubspannung führt in dieser Arbeit dagegen zu einer Herabregulation der AP-1-Bindungsaktivität. Ein potenzielles Zielgen ist VCAM-1, das durch chronische Schubspannung AP-1-abhängig herabreguliert wird (Korenaga et al., 1997). Ein interessanter Befund ist die hier gezeigte ET_B-abhängige Induktion der c-jun-Expression. Da die c-jun-Induktion durch Schubspannung auch NO-abhängig erfolgt, kann ein Signalweg der c-jun-Induktion über schubspannungsabhängige ET-1-Freisetzung und anschließende ET_B-vermittelte NO-Freisetzung postuliert werden (Abb. 52).

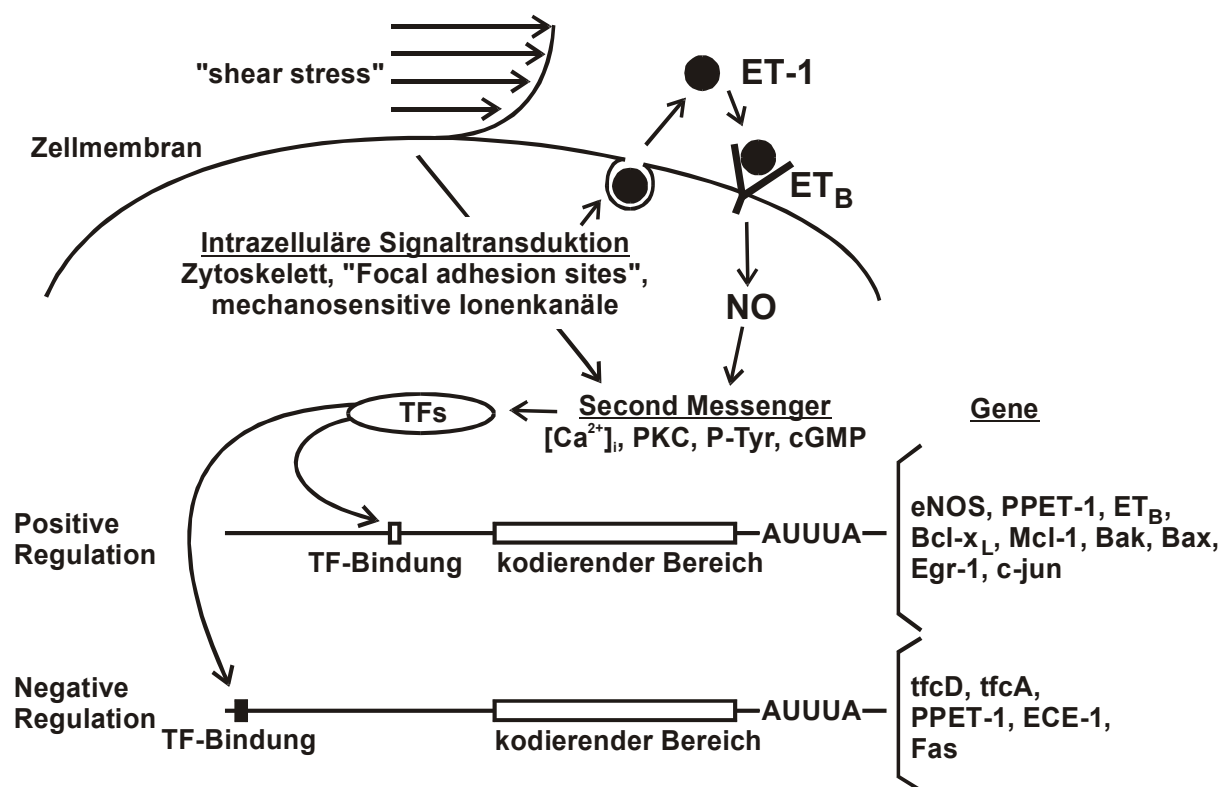


Abb. 52: Schubspannungsabhängige Regulation der Genaktivität durch Transkriptionsfaktoren in Endothelzellen. Applikation von Schubspannung ("shear stress") führt über ET-1-Freisetzung und ET_B-vermittelte NO-Freisetzung oder über ET-1-unabhängige intrazelluläre Signaltransduktionsmechanismen zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (TF), die durch Bindung an spezifische Promotorbereiche die Genaktivität positiv oder negativ beeinflussen.

Neben Egr-1 und AP-1 sind weitere Transkriptionsfaktoren beschrieben worden, die schubspannungsabhängig reguliert werden. Das im PDGF-B-Promotor identifizierte “shear stress responsive element” (Resnick et al., 1993) stellt eine NF- κ B-Bindungsstelle dar (Khachigian et al., 1995). Für den Transkriptionsfaktor NF- κ B wurde eine transiente Induktion, jedoch eine Herabregulation durch chronische hohe Schubspannung beschrieben (Lan et al., 1994; Mohan et al., 1997). Schubspannung induziert das “tissue factor”-Gen durch Bindung von phosphoryliertem SP-1 (Lin et al., 1997) und Egr-1 (Houston et al., 1999). Der Transkriptionsfaktor Elk-1 wird ebenfalls durch Schubspannung aktiviert (Jalali et al., 1998). Damit wurde für eine Reihe von Transkriptionsfaktoren eine zeit-, dosis-, und speziesabhängige Induktion durch Schubspannung gezeigt. Daneben ist die gefäßspezifische Herkunft und die Passage kultivierter Endothelzellen für die biomechanische Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren von Bedeutung (Du et al., 1995; Stula et al., 2000).

Die zeit- und dosisabhängige Induktion des Transkriptionsfaktors Egr-1 durch zyklische Dehnung in glatten Muskelzellen (VSMC) in der vorliegenden Arbeit (Morawietz et al., 1999a) ist vergleichbar mit der dehnungsinduzierten Egr-1-Induktion in Kardiomyozyten (Sadoshima et al., 1992) und Mesangiumzellen (Akai et al., 1994). In detaillierteren Studien zum Zeitverlauf der Egr-1- und c-jun-Induktion durch Dehnung konnten wir eine erhöhte mRNA-Expression bereits nach 7 min nachweisen. Nach einem Maximum bei 30 min wird die mRNA-Expression beider Gene nach 4 h bzw. 2 h zyklischer Dehnung wieder auf Basalniveau reguliert. Die schnelle Herabregulation der Egr-1- und c-jun-mRNA-Expression während kontinuierlicher mechanischer Dehnung könnte durch negative Regulation weiterer Transkriptionsfaktoren oder ein RNA-abbauendes Enzym mediiert sein. Dies wird durch die verlängerte und verstärkte “superinduction” beider mRNAs in dieser Arbeit nach Dehnung mit dem Inhibitor der *de novo*-Proteinsynthese Cycloheximid unterstützt. Dieser Effekt könnte durch die Hemmung der Neusynthese eines Proteins vermittelt sein, das die Transkription beider Gene herabreguliert. Zusätzlich verhindert Cycloheximid die Synthese eines Proteins, das das Poly-A-Ende spezifischer mRNAs abbaut (Shaw and Kamen, 1986) und so zahlreiche “immediate-early”-Gene “superinduziert” (Kelly et al., 1983; Ryder and Nathans, 1988).

Ein Nachweis der transkriptionellen Aktivierung von Egr-1 durch Dehnung konnte in dieser Arbeit durch Induktion eines transfizierten 957 bp-full-length-Promotor-CAT-Konstrukts in VSMC geführt werden. Dieser Promotorbereich enthält u.a. 2 AP-1-, 4 SP-1- und 4 Egr-1-Bindungsstellen sowie 2 “cAMP responsive elements” und 6 CArG-Boxen (Tsai-Morris et al., 1988). Jeder dieser Promotorbereiche oder bisher nicht identifizierte

Bindungsstellen könnten ein “strain responsive element” sein. Da der Transkriptionsfaktor AP-1 aus c-jun-Homodimeren oder c-jun/c-fos-Heterodimeren bestehen kann, spricht die Aktivierung von c-jun, jedoch nicht von c-fos, für eine Aktivierung von c-jun-Homodimeren durch Dehnung. Dies ist in Übereinstimmung mit den EMSA-Daten nach Applikation von Schubspannung auf Endothelzellen, die ebenfalls für eine Aktivierung von c-jun-Homodimeren durch biomechanische Kräfte sprechen. Eine Rolle von c-jun in der intrazellulären Antwort auf Dehnung wird durch die dehnungsabhängige Aktivierung der N-terminalen c-jun-Kinase in VSMC unterstützt (Reusch et al., 1997). Daneben wird SP-1 durch Dehnung induziert (Wilson et al., 1998). Eine funktionelle Wechselwirkung zwischen Egr-1 und SP-1 wurde im PDGF-A-Promotor nach Applikation von Schubspannung in Endothelzellen gezeigt (Khachigian et al., 1997). Dabei wurde nach Applikation von Schubspannung eine Bindung von Egr-1 an den PDGF-A-Promotor nachgewiesen, die zu einer Ablösung von SP-1 von seiner überlappenden Bindungsstelle führte. Eine funktionelle Bindung von Egr-1 an den PDGF-A-Promotor konnte auch nach Dehnung in VSMC gezeigt werden (Wilson et al., 1998).

In den Dehnungsexperimenten wurde in der vorliegenden Arbeit der minimale Stimulus ermittelt, der eine transkriptionelle Aktivierung in VSMC auslösen kann. In früheren Untersuchungen steigerte ein einzelner mechanischer Stimulus von 5 min Dauer die DNA-Synthese in adulten humanen VSMC (Cheng et al., 1996). In Kardiomyozyten reichte bereits eine kontinuierliche mechanische Dehnung von 1 min aus, die c-fos-mRNA zu induzieren (Sadoshima and Izumo, 1993). In unseren Untersuchungen war dagegen bereits ein einzelner Zyklus aus Dehnung/Relaxation von 1 sec ausreichend, die Egr-1 und c-jun-mRNA zu induzieren. Dies ist die kürzeste bisher beschriebene mechanische Stimulation einer Zelle, die zu einer Induktion von Genaktivität führt. Die minimale Dehnungsamplitude zur Induktion der Egr-1- und c-jun-Transkription durch einen Einzelzyklus wurde dabei mit 5 bis 10% bestimmt. Da das Dehnungsprofil aufgrund der Geometrie der Flexcell-Platte nicht homogen ist und zahlreiche Zellen in der Mitte der Membran deutlich niedrigerer Dehnung ($\leq 3\%$) ausgesetzt sind, liegt der Schwellenwert der Induktion von Egr-1 durch Dehnung möglicherweise noch etwas unterhalb 10%. Ein ähnlicher Schwellenwert der Induktion von Egr-1 wurde jedoch in eigenen unabhängigen Experimenten auf homogen dehnbaren Silikonmembranen nach 1 sec Dehnung ($\geq 10\%$) und anschließender stationärer Inkubation gefunden. Der Schwellenwert zur Induktion von Egr-1 durch 30 min zyklische Dehnung war mit 5% geringer, als nach Einzeldehnung. Obwohl die *in vitro*-Daten nicht direkt mit VSMC *in vivo* verglichen werden können, liegen diese Schwellenwerte im Bereich von 6 bis 22%

Dehnung, die für intakte arterielle Gefäße beschrieben werden (Osol, 1995). Es ist jedoch auch möglich, daß der Schwellenwert *in vivo* erst bei Gefäßverletzungen oder erhöhter Dehnung in hypertensiven Gefäßen erreicht wird (Baumbach, 1991).

Mechanische Dehnung wird durch spezifische Zell-extrazelluläre Matrix-Wechselwirkungen in VSMC erkannt (Wilson et al., 1995). Dabei wird auf Fibronectin (FN), jedoch nicht auf Laminin (LN) die DNA-Synthese induziert und die MAP-Kinase aktiviert (Reusch et al., 1997). Auf LN dagegen induziert Dehnung in VSMC vorrangig Differenzierung, da z.B. die Expression von "smooth muscle myosin"-Isoformen induziert und die N-terminale c-jun-Kinase aktiviert werden (Reusch et al., 1996). Die Induktion der Egr-1-Expression auf Kollagen Typ 1 (Col I) und dem Fibronectin-ähnlichen Protein Pronektin (FN) in der vorliegenden Arbeit entspricht einer proliferativen Zellantwort auf Dehnung. In unseren Experimenten nach Plattierung auf unterschiedlichen extrazellulären Matrices war die maximale Induktion von Egr-1 geringer, als nach längerem Wachstum auf Col I. Eine Ursache könnte die kürzere Inkubation von 24 h gegenüber 72 h in serumfreien Medium sein, um die *de novo*-Bildung von extrazellulären Matrixproteinen zu minimieren. Die Ursache der gezeigten höheren Basalexpression von Egr-1 auf Laminin (LN) korreliert mit einer höheren Thymidininkorporation im Vergleich zu Experimenten auf Col I oder FN (Wilson et al., 1995). Die Basalexpression von c-jun auf LN war ebenfalls erhöht, die c-jun-Expression nach Applikation von Dehnung aber auf allen 3 Matrices gleich. Damit korreliert insbesondere die Egr-1-Expression eng mit der DNA-Synthese der VSMC auf den unterschiedlichen extrazellulären Matrices. Unsere Daten unterstützen die Hypothese, daß Egr-1 zur Induktion der PDGF-A-Transkription und damit PDGF-Sekretion durch Dehnung in VSMC beiträgt (Wilson et al., 1993; Wilson et al., 1998). Die c-jun-Expression und die N-terminale c-jun-Kinase sind dagegen auf allen 3 Matrices gleichermaßen induziert. Dies scheint ein allgemeineres Aktivierungsmuster in Antwort auf extrazellulären Streß darzustellen. Die VSMC der Media größerer Arterien sind vorrangig von dem extrazellulären Matrixprotein Kollagen (insbesondere Typ 1) umgeben (Ross, 1992). In pathophysiologischen Zuständen, vorrangig in der Spätphase der Atherosklerose, erhöhen sich die mechanischen Kräfte in der Gefäßwand. Die VSMC dedifferenzieren und proliferieren unter diesen Umständen verstärkt und erhöhen die DNA-Synthese. Dabei synthetisieren und sezernieren sie verstärkt Bindegewebsproteine wie Kollagen, wodurch diese Veränderungen im VSMC-Phänotyp weiter verstärkt werden. Typische VSMC dieses aktivierten proliferierenden Phänotyps findet man im fibrotischen Plaque. Die Induktion von

mitogenen Genprodukten wie Egr-1 und c-jun auf Col I könnte in diese pathophysiologischen Veränderungen der Gefäßwand *in vivo* involviert sein.

Egr-1 wurde in dieser Arbeit durch Dehnung auf Proteinebene geringer induziert, als auf mRNA-Ebene. Dies könnte auf posttranskriptionelle bzw. posttranslationale Regulationsmechanismen zurückzuführen sein. Daneben wurde durch Immunfluoreszenz bereits unter Basalbedingungen ein Pool an Egr-1-Proteinen im perinukleären Raum nachgewiesen, der möglicherweise eine negative Rückkopplung bewirkt. Die physiologische Relevanz der Egr-1-Induktion durch Dehnung wird durch die gezeigte Translokation des Egr-1-Proteins aus dem perinukleären Raum in den Zellkern unterstützt. Interessanterweise wurde diese Translokation nur in den maximal gedehnten VSMC an der Peripherie der Flexcell-Platten (25% Dehnung), jedoch nicht in der Mitte der Schale ($\leq 3\%$ Dehnung) beobachtet. Dies spricht für einen direkten Effekt von Dehnung auf die Zellen, und nicht für eine dehnungsabhängige Sekretion von Faktoren wie PDGF (Wilson et al., 1993), die anschließend die Egr-1-Translokation auslösen.

In Zusammenfassung konnte in unseren Experimenten eine zeit- und dosisabhängige Induktion der Egr-1- und c-jun-Expression und Translokation durch Dehnung in VSMC gezeigt werden. Der Signaltransduktionsweg wird über spezifische Zell/extrazelluläre Matrix-Interaktionen vermittelt. Egr-1 und c-jun könnten dehnungsabhängig die Genexpression in Entwicklungsprozessen oder bei adaptiver Anpassung nach Verletzung oder bei Hypertonie regulieren (Khachigian et al., 1996). Die induzierbare Expression von Egr-1-abhängigen Genen ist als Paradigma in der transkriptionellen Aktivierung in Endothelzellen und VSMC der Gefäßwand postuliert worden (Khachigian and Collins, 1997). Unsere Daten sprechen vorrangig für eine frühe Aktivierung von Egr-1 durch erhöhte zyklische Dehnung, die anschließend die PDGF-A-Expression und PDGF-Sekretion induziert und damit die Proliferation von VSMC in der Gefäßwand steigert.

5.2. Induktion von Superoxidanionbildung und oxLDL-Aufnahme in Endothelzellen

5.2.1. Nachweis und molekulare Charakterisierung von NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten in humanen Endothelzellen

Vaskuläre NAD(P)H-Oxidasen, die ähnlich zu dem granulocytären Enzymkomplex sind, werden als Hauptquelle der Superoxidanionbildung in Gefäßen angesehen (Griendling et al., 2000). Um molekulare Ursachen für die unterschiedliche Kinetik und Substratspezifität zwischen endothelialer und granulocytärer NAD(P)H-Oxidase zu identifizieren, wurden in der vorliegenden Arbeit die kodierenden Bereiche der potenziell substratbindenden

NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten gp91phox und p67phox aus der endothelialen Zelllinie ECV304 amplifiziert, sequenziert und mit den bereits bekannten Sequenzen aus Granulocyten verglichen (Segal et al., 1992; Ravel and Lederer, 1993; Smith et al., 1996). Im gesamten kodierenden Bereich von gp91phox wurde kein Hinweis auf eine veränderte Substratspezifität zwischen Endothelzellen und Granulocyten gefunden. Dies ist in Übereinstimmung mit kürzlichen Untersuchungen in HUVEC (Görlach et al., 2000). In p67phox konnten wir 2 Punktmutationen nachweisen. Beide Basenpaaraustausche sind jedoch bekannte Polymorphismen des p67phox-kodierenden Gens NCF2 ohne funktionellen Einfluß auf die NAD(P)H-Oxidase-Aktivität (Nunoi et al., 1988; Patino et al., 1999). In der DNA-Sequenz beider Untereinheiten konnte damit keine strukturelle Basis für die veränderte Substratspezifität in Endothelzellen bzw. Granulocyten identifiziert werden.

Die vergleichsweise geringe Expression der p67phox und gp91phox könnte die Ursache für die niedrige Superoxidanionbildung in Endothelzellen sein. Die gp91phox-mRNA-Expression korreliert in dieser Arbeit dabei am besten mit der DPI-hemmbarer Superoxidanionbildung (beide ca. 1% der Werte bei Granulocyten). Da alle 4 Untereinheiten für einen funktionell aktiven NAD(P)H-Oxidase-Komplex notwendig sind (Uhlinger et al., 1993; Huang et al., 1995; Wallach and Segal, 1996), sind die Unterschiede in der Kinetik zwischen beiden Zelltypen wahrscheinlich auf die niedrige gp91phox-Expression in Endothelzellen zurückzuführen. Daher kann postuliert werden, daß die gp91phox-Expression wahrscheinlich die endotheliale NAD(P)H-Oxidase-Aktivität limitiert.

5.2.2. Induktion der NAD(P)H-Oxidase durch Angiotensin-II, Endothelin-1 und oxLDL

Die dosisabhängige bimodale Regulation der gp91phox-Expression wurde in der vorliegenden Arbeit auch auf funktioneller Ebene beobachtet. Vergleichbare Daten auf funktioneller Ebene haben unabhängig andere Arbeitsgruppen beschrieben. So wurde in humanen Endothelzellen aus Nebelschnurarterien eine dosisabhängige Steigerung der Superoxidanionbildung bis 100 nM Ang II, jedoch eine geringere Induktion bei 1 µM Ang II gezeigt (Zhang et al., 1999). In mikrozirkulären Endothelzellen des Meerschweinchens wurde die Superoxidanionbildung bis 1 nM Ang II induziert, während höhere Ang II-Dosen zu einer geringeren Aktivierung führt (Lang et al., 2000). Zusätzlich wurde im Kaninchenmodell eine vergleichbare dosisabhängige Superoxidanionbildung durch Ang II (max. 10 nM) in Fibroblasten der Adventitia beobachtet (Pagano et al., 1997). Die hohe Korrelation von Ang II-regulierter endothelialer gp91phox-Expression und NAD(P)H-Oxidase-Aktivität in dieser Arbeit unterstützt die Hypothese, daß gp91phox die limitierende NAD(P)H-Oxidase-

Untereinheit in Endothelzellen ist. Dies wird dadurch unterstützt, daß wir für die 3 anderen Untereinheiten keine Hemmung der Induktion bei höheren Ang II-Dosen nachweisen konnten.

Die in dieser Arbeit gezeigte Hemmung der Ang II-induzierten gp91phox-Expression und NAD(P)H-Oxidase-Aktivität durch Candesartan spricht für einen AT₁-vermittelten Mechanismus. Eine vergleichbare AT₁-vermittelte Hemmung auf funktioneller Ebene wurde in Endothelzellen (Zhang et al., 1999; Lang et al., 2000), VSMC (Griendling et al., 1994) und intakten Aortensegmenten (Warnholtz et al., 1999; Berry et al., 2000) nachgewiesen. Nur in Fibroblasten war die Ang II-induzierte Superoxidanionbildung nicht AT₁-vermittelt (Pagano et al., 1997). Eine mögliche Erklärung für die geringere Wirksamkeit höherer Ang II-Dosen könnte ein negativer “feed back”-Mechanismus auf die AT₁-Expression oder -Funktion sein. Da in VSMC auch bei höheren Ang II-Dosen von 1 µM die NAD(P)H-Oxidase aktiviert wird, erscheint dieser Mechanismus unwahrscheinlich. Außerdem werden parallel in den gleichen Zellen alle anderen NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten auch bei 1 µM induziert. In Fibroblasten und Endothelzellen führte selektive AT₂-Rezeptorblockade zu potenziierter Superoxidanionbildung (Pagano et al., 1997; Sohn et al., 2000b). In unseren Untersuchungen wurde gezeigt, daß die partielle Hemmung bei höheren Ang II-Dosen durch AT₂-medierte Hemmung der gp91phox-Expression erklärt werden kann. Da für AT₁ und AT₂ eine vergleichbare Affinität zu Ang II gezeigt wurde (Timmermans et al., 1993), könnten die unterschiedlichen Schwellenwerte der AT₁-vermittelten Induktion bzw. der AT₂-vermittelten Repression durch unterschiedliche Rezeptordichten erklärt werden. Dies wird durch die in Endothelzellen beschriebene höhere Expression von AT₁- zu AT₂-Rezeptoren unterstützt (Li et al., 1999). Somit könnte das gefäß- und passagespezifische Verhältnis von AT₁- zu AT₂-Rezeptoren die dosisabhängige Induktion oder Repression der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität bestimmen. Eine Rolle als AT₁-Gegenspieler wird für den AT₂-Rezeptor durch tierexperimentelle Studien unterstützt. Im Rattenmodell wird erhöhter Blutdruck bei Ang II-Infusion durch AT₂-Rezeptorblockade weiter gesteigert (Munzenmaier and Greene, 1996). Die AT₂-Rezeptor-knock out-Maus hat bereits unter Basalbedingungen einen erhöhten Blutdruck (Ichiki et al., 1995). Zusätzlich verhinderte Überexpression des AT₂-Rezeptors im Mausmodell die Blutdrucksteigerung durch Ang II-Infusion (Tsutsumi et al., 1999). Diese Resultate könnten einfach durch einen “scavenging effect” durch vermehrte Bindung von Ang II an den AT₂-Rezeptor erklärt werden, wodurch die AT₁-vermittelten Effekte geringer sind. Daneben sind spezifische funktionelle Wechselwirkungen zwischen beiden Rezeptoren denkbar (Unger, 1999).

ET-1 induziert in der vorliegenden Arbeit transient die gp91phox-mRNA und die Superoxidanionbildung (Duerrschmidt et al., 2000). Der ET-1-Effekt erreicht bereits nach 1 h auf mRNA-Ebene und nach 1,5 h auf funktioneller Ebene sein Maximum. Die Induktion ist ET_B-Rezeptor-vermittelt. Dies ist in Übereinstimmung mit unseren initialen Befunden, daß HUVEC fast ausschließlich den ET_B-Rezeptor, jedoch nicht den ET_A-Rezeptor exprimieren (Heinroth-Hoffmann et al., 1998). In unseren Untersuchungen wurde die Methode der Coelenterazin-vermittelten Chemilumineszenz (Lucas and Solano, 1992) für die Messung der endothelialen Superoxidanionbildung etabliert. Diese Methode hat im Gegensatz zu der in der Literatur derzeit am weitesten verbreiteten Methode der Lucigenin-vermittelten Chemilumineszenz den Vorteil einer höheren Sensitivität ohne die Lucigenin-typische Eigenproduktion von Superoxidanionen durch univalente Reduktion mit folgender Autooxidation (Liochev and Fridovich, 1997; Vasquez-Vivar et al., 1997; Tarpey et al., 1999).

Die NAD(P)H-Oxidase ist vorrangig in der Plasmamembran lokalisiert, aber auch eine mikrosomale Lokalisation wird diskutiert (Mohazzab and Wolin, 1994). Exogene Applikation von NADPH auf intakte Endothelzellen führte in unseren Untersuchungen nur zu einer minimalen funktionellen Induktion der NAD(P)H-Oxidase, die nicht statistische Signifikanz erreichte. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß Nukleotide in der Regel Membranen nicht passieren können (Bishop et al., 1959; Liersch et al., 1971). Damit sprechen diese Daten für die Membranintegrität der kultivierten Endothelzellen. Da Coelenterazin als lipophile Substanz die Zellmembran passieren kann, spricht die basale und ET-1-stimulierbare Superoxidanionbildung für eine intrazelluläre NADPH- und O₂⁻-Quelle in HUVEC. Im Gegensatz zur XO/X-induzierten Superoxidanionbildung hatten in unseren Experimenten in intakten HUVEC SOD und DPI nur einen minimal hemmenden Effekt auf die ET-1-stimulierbare O₂⁻-Bildung. Diese Daten unterstützen eine intrazelluläre Lokalisation der NAD(P)H-Oxidase, da SOD aufgrund seiner Größe nicht die Zellmembran passieren kann. Das polare DPI kann wahrscheinlich ebenfalls nicht die Zellmembran in Konzentrationen passieren, die zur vollständigen Hemmung der NAD(P)H-Oxidase notwendig sind. Damit sprechen unsere Daten für eine NAD(P)H-Oxidase als Hauptquelle der endothelialen Superoxidanionbildung. Weitere O₂⁻-generierende Enzyme könnten jedoch ebenfalls involviert sein.

Die gezeigte ET-1-stimulierte Superoxidanionbildung kann zum proatherosklerotischen Potenzial von Endothelin beitragen. Erhöhte Superoxidanionbildung könnte zu verstärkter Peroxynitritbildung mit verringerter NO-Verfügbarkeit führen. Zusätzlich wird die erhöhte

Superoxidanionbildung bei Nitrattoleranz durch den nicht-selektiven ET-Rezeptor-Blocker Bosentan partiell normalisiert (Kurz et al., 1999). Außerdem könnte die ET-1-induzierte O_2^- -Bildung zu vermehrter oxidativer Modifikation von LDL in proatherosklerotisches oxLDL führen.

Im Gegensatz zu LDL induziert oxLDL selbst die Superoxidanionbildung in Endothelzellkulturen und intakten Aortensegmenten (Galle et al., 1999; Galle et al., 2000). Pharmakologische und Antisense-Oligonukleotid-Experimente weisen dabei auf eine NAD(P)H-Oxidase als Superoxidanionquelle hin (Heinloth et al., 2000). Unsere Daten zur Induktion der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit gp91phox-mRNA-Expression durch oxLDL sprechen als molekulare Ursache für eine transkriptionelle Aktivierung. Die parallel gezeigte funktionelle Aktivierung der Superoxidanionbildung in HUVEC unterstützt die Hypothese, daß die gp91phox-Expression die endotheliale Superoxidanionbildung limitiert. Der transiente Charakter der gp91phox- und Superoxidanion-Induktion weist auf eine schnelle Aufnahme und anschließende Inaktivierung des oxLDLs, z.B. durch den endothelialen oxLDL-Rezeptor LOX-1, hin. Erhöhte LDL-Plasmaspiegel führen zu einer verstärkten LDL-Aufnahme in die Intima (Nordestgaard et al., 1992). Daher kann ein proatherosklerotischer *Circulus vitiosus* aus erhöhter NAD(P)H-Oxidase-Expression und -Aktivität, verstärkter oxidativer Modifikation von LDL zu oxLDL, erhöhter oxLDL-Aufnahme und anschließender Potenzierung durch weitere Steigerung der Superoxidanionbildung in humanen Endothelzellen postuliert werden (Abb. 53). Dieser *Circulus vitiosus* wird durch Ang II und ET-1 weiter beschleunigt.

Die durch Depolarisation induzierte endotheliale Superoxidanionbildung in dieser Arbeit könnte ebenfalls eine proatherosklerotische Wirkung haben (Sohn et al., 2000a). Die Endothelzellen können über heterologe "gap junctions" akute und chronische Veränderungen im Membranpotential der benachbarten VSMC medieren (Beny and Pacicca, 1994; Marchenko and Sage, 1994). Die VSMC von hypertensiven Ratten sind chronisch depolarisiert (Martens and Gelband, 1996). In isolierten Gefäßen bewirkt erhöhter intramuraler Druck ebenfalls die verstärkte vaskuläre Superoxidanionbildung (Huang et al., 1998). Dies könnte u.a. zu verstärkter VSMC-Proliferation mit nachfolgender Gefäßhypertrophie führen (Wolin, 1996).

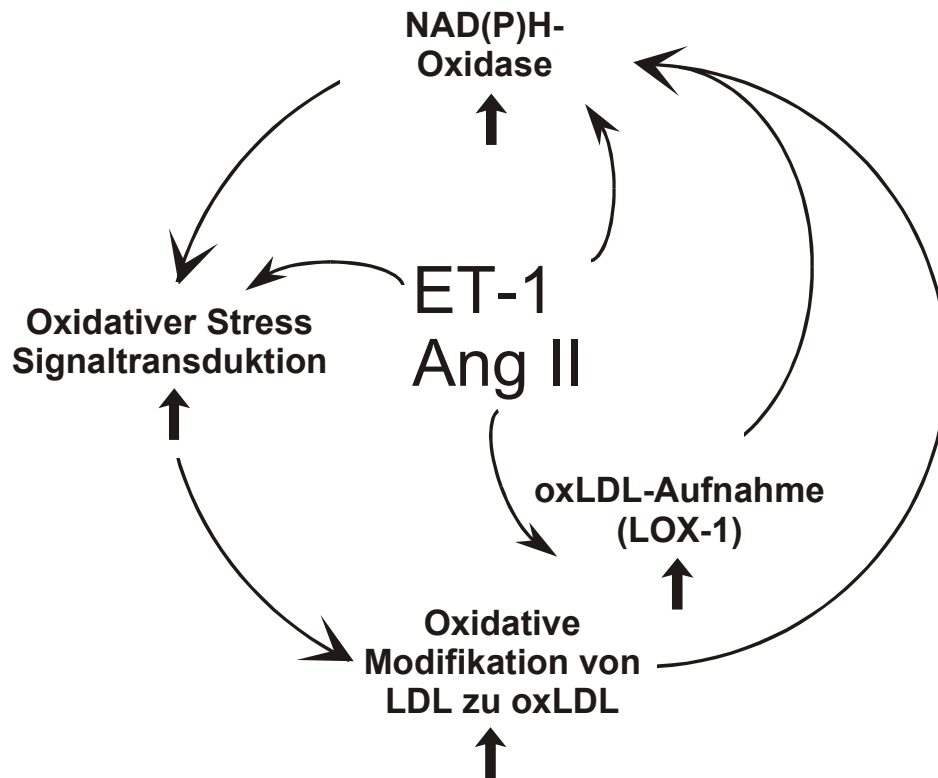


Abb. 53: Proatherosklerotischer *Circulus vitiosus* aus NAD(P)H-Oxidase-Aktivität, oxidativem Streß, oxidativer Modifikation von LDL, oxLDL-Aufnahme und weiterer Steigerung der NAD(P)H-Oxidase-Expression in humanen Endothelzellen. Dieser Kreislauf wird durch Ang II und ET-1 potenziert.

5.2.3. Induktion der oxLDL-Aufnahme durch Angiotensin-II und Endothelin-1

In der Frühphase der Atherosklerose könnte die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Ang II- und ET-1-induzierte oxLDL-Aufnahme involviert sein (Morawietz et al., 1999b). Dies würde zu endothelialer Dysfunktion (Kugiyama et al., 1990), Infiltrierung der Gefäßwand mit Monozyten/Makrophagen durch erhöhte Adhäsionsmolekülexpression (Khan et al., 1995) und Freisetzung von VSMC-Wachstumsfaktoren mit nachfolgender Gefäßhypertrophie führen (Chai et al., 1996). Frühe proatherosklerotische Effekte von oxLDL sind die Verzögerung der endothelialen Wundheilung (z.B. durch Hemmung der Migration von Endothelzellen in die Läsion), Zytotoxizität (z.B. durch Radikalbildung) und Induktion von Apoptose in Endothelzellen (Galle et al., 1995; Steinberg, 1997; Dimmeler et al., 1997a). Die Ang II- und ET-1-stimulierte oxLDL-Aufnahme würde so proatherosklerotische Prozesse in den Endothelzellen in der Frühphase der Erkrankung fördern, bevor Makrophagen in die Pathogenese der Atherosklerose involviert sind. Der oxLDL-Rezeptor LOX-1 wurde kürzlich auf Makrophagen nachgewiesen (Yoshida et al., 1998). Damit könnten Ang II und ET-1 auch die Schaumzellbildung durch oxLDL-Aufnahme in Makrophagen stimulieren. Die Hemmung

der Ang II- und ET-1-stimulierten oxLDL-Aufnahme durch AT₁- und ET_B-Rezeptorblockade spricht somit für ein antiatherosklerotisches Potenzial dieser Therapiestrategien.

5.3. Klinische und tierexperimentelle Untersuchungen

5.3.1. Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit gp91phox und von LOX-1 in arteriellen Biopsien von Patienten mit koronarer Herzkrankheit

Da in Endothelzellen *in vitro* Ang II und oxLDL die NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit gp91phox induzieren, könnte medikamentöse Hemmung der Ang II-Bildung durch ACE-Hemmer, Blockade der Ang II-Wirkung durch AT₁-Rezeptor-Blocker oder Reduktion des LDL-Spiegels durch CSE-Hemmer-Therapie ebenfalls einen Einfluß auf die vaskuläre gp91phox-Expression haben. Die in dieser Arbeit gezeigte Herabregulation der gp91phox-Expression in A. mammaria-Biopsien spricht für ein antiatherosklerotisches Potenzial der chronischen AT₁-Rezeptorblockade und CSE-Hemmer-Therapie durch Senkung des vaskulären Potenzials zur Generierung von Superoxidanionen. Die nachgewiesene vaskuläre gp91phox-Expression hat ihre Quelle wahrscheinlich vorrangig in Endothelzellen, Granulocyten oder Fibroblasten, da VSMC keine gp91phox exprimieren (Griendling et al., 2000). Die gp91phox-Expression konnte durch ACE-Hemmer-Therapie nicht gesenkt werden. Dies muß in größeren Patientenkollektiven verifiziert werden. Eine denkbare Erklärung für den fehlenden Effekt der ACE-Hemmer-Therapie im Vergleich zum AT₁-Rezeptor-Blocker könnte die vergleichsweise niedrige Dosierung der ACE-Hemmer in dieser retrospektiven Studie sein. Dadurch könnten lokal erhöhte Ang II-Werte auf eine Dosis reduziert sein, daß die gp91phox-Expression trotzdem induziert. CSE-Hemmer zeigen *in vitro* zusätzlich einen Effekt auf die NAD(P)H-Oxidase-Aktivität durch Wechselwirkung mit kleinen G-Proteinen (Wagner et al., 2000). Damit können unterschiedliche Mechanismen für ein antioxidatives Potenzial der CSE-Hemmer durch verringerte NAD(P)H-Oxidase-Aktivität verantwortlich sein.

Eine pharmakologische Senkung der Ang II-Konzentration durch ACE-Hemmer reduzierte dagegen in der vorliegenden Arbeit die LOX-1-Expression in arteriellen Biopsien von Patienten mit KHK (Morawietz et al., 1999b). Dieser Mechanismus könnte zum positiven Effekt von ACE-Hemmer-Therapie auf die Prognose von Patienten mit KHK (Yusuf et al., 2000) beitragen. Um den Einfluß einer AT₁-Rezeptorblockade auf die LOX-1-Expression in arteriellen Biopsien von Patienten mit KHK zu analysieren, wurde eine derzeit laufende klinische Vergleichsstudie (EPAS: Endothel-Protektion, AT₁-Blockade und Cholesterin-abhängiger oxidativer Streß-Studie) in Zusammenarbeit mit dem Herzzentrum der Universität

Leipzig initiiert. Die Studie soll den Effekt von AT₁-Rezeptorblockade und CSE-Hemmer-Therapie auf die Expression antiatherosklerotischer und kardioprotektiver Gene in Gefäßbiopsien von Patienten mit KHK überprüfen. Damit können die *in vitro*-Daten in klinischen Untersuchungen überprüft werden.

5.3.2. Wechselwirkungen des Renin-Angiotensin- und des Endothelin-Systems *in vitro* und *in vivo*

Ein wichtiger kardiovaskulärer Risikofaktor ist Übergewicht durch fettreiche Ernährung (Krauss et al., 1998; Calle et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte die im Maus-Modell beobachtete erhöhte ACE-Aktivität in der Niere übergewichtiger Tiere durch ET_A-Rezeptorblockade reduziert werden (Barton et al., 2000a, b). Diese Normalisierung war unabhängig von einem direkten Effekt auf die ACE-Aktivität *in vitro* oder auf das Körpergewicht. Dies spricht für eine organspezifische Regulation der ACE-Aktivität in der Niere durch ET_A. Dabei können posttranslationale oder funktionelle Modifikationen der ACE-Aktivität involviert sein. Eine lokale Erhöhung der ACE-Aktivität verstärkt die Proliferation und Vasokonstriktion durch direkte Ang II-Wirkung und durch sekundäre Steigerung der ET-1-Bildung. Neben dem Effekt auf die ACE-Aktivität wurde bei ET_A-Rezeptorblockade eine reduzierte ET-1-Konzentration in der Aorta und ein erhöhter HDL-Spiegel im Plasma beobachtet. Eine ET_A-Rezeptor-Blocker-Therapie könnte durch diese neuen Mechanismen zusätzliche kardioprotektive und antiatherosklerotische Wirkungen haben.

Das kardiovaskuläre Risiko erhöhten Alters wurde in dieser Arbeit im Ratten-Modell untersucht (Goettsch et al., 2001). Die altersabhängige Erhöhung der vaskulären ET-1-Bildung wird von einer parallelen Erhöhung der NO-Bildung begleitet, wobei keine Erhöhung des Blutdrucks resultiert. Der zugrundeliegenden Mechanismus ist noch nicht aufgeklärt. Die ET-1-Expression wird durch eine Reihe von Faktoren beeinflusst, die altersabhängig reguliert werden. Dazu gehören Ang II (Imai et al., 1992), TGF- β (Hahn et al., 1990), reduzierte NO-Verfügbarkeit (Boulanger and Luscher, 1990; Barton et al., 1997) oder Östrogen (Morey et al., 1998). Darüber hinaus ist Alter mit einer erhöhten Superoxidanionbildung assoziiert (Ruiz-Torres et al., 1997; Gwinner et al., 1998), die vaskulär auf einer erhöhten gp91phox-Expression beruht (Morawietz et al., eingereicht). Eine erhöhte O₂⁻-Bildung kann ebenfalls die ET-1-Freisetzung durch transkriptionelle Aktivierung des PPET-1-Promotors stimulieren (Gabriel et al., 1998; Kahler et al., 2000).

Die altersabhängige vaskuläre Regulation der eNOS-Expression ist widersprüchlich. Während in 18 Monate alten Ratten wie in dieser Arbeit eine erhöhte vaskuläre eNOS-

Expression beobachtet wurde (Cernadas et al., 1998), war die eNOS-Expression in 33 Monate alten Tieren erniedrigt (Barton et al., 1997). Die Ursachen für diese Unterschiede könnten in alters- oder stammspezifischen Unterschieden liegen. Die gezeigte erhöhte iNOS-mRNA-Expression kann proatherosklerotische und die Endothelfunktion beeinflussende Konsequenzen haben (Kessler et al., 1997; Detmers et al., 2000) und damit zur altersabhängigen Einschränkung der Gefäßfunktion beitragen (Zeiher et al., 1993; Barton et al., 1997).

Eine Wechselwirkung zwischen RAS und ET-System wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf der Ebene der ECE-1-Expression in *A. mammaria*-Biopsien von Patienten mit KHK gezeigt. Die Herabregulation der ECE-1-Expression durch ACE-Hemmer-Therapie spricht für eine Ang II-vermittelte Stimulation der ECE-1-Expression. Erste Hinweise auf eine erhöhte Expression von ECE-1-Isoformen nach Ang II-Gabe in HUVEC (Goettsch et al., in Vorbereitung) unterstützen diese Hypothese.

Eine erhöhte ECE-1-Expression wurde in dieser Arbeit in atrialem und ventrikulären Myokard von Patienten mit KHK bzw. Herzinsuffizienz gezeigt. Im atrialen Myokard von Postinfarkt-Patienten wurde bereits eine erhöhte ECE-1-Expression beschrieben (Bohnemeier et al., 1998). Eine erhöhte myokardiale Expression und Aktivität von ECE-1 wurde auch im im Tiermodell des herzinsuffizienten Schweins nachgewiesen (Ergul et al., 2000).

Die erhöhte ECE-1-Expression wird in der vorliegenden Arbeit durch präoperative ACE-Hemmer-Therapie partiell normalisiert. Dies könnte die kürzlich beschriebene unveränderte ECE-1-Expression im ventrikulären Myokard von Herzinsuffizienz-Patienten mit ACE-Hemmer-Therapie erklären (Zolk et al., 1999). Eine erhöhte ECE-1-Expression kann die lokale ET-1-Synthese steigern und die lokale proteolytische Spaltung der erhöhten big-ET-1-Plasmaspiegel im Myokard von Patienten mit Herzinsuffizienz bewirken. Dies wird durch die in dieser Arbeit im Myokard gemessenen ET-1-Peptidwerte unterstützt. Die partielle Hemmung der ECE-1-Expression könnte zum kardioprotektiven Potenzial der ACE-Hemmer beitragen. Die trotz ACE-Hemmer-Therapie erhöhte myokardiale ECE-1-Expression läßt daneben ein kardioprotektives Potenzial einer ECE-Hemmer-Therapie vermuten.

Die Daten zur Expression der ET-Rezeptoren variieren in Abhängigkeit von den untersuchten Patientenkollektiven. In ersten Untersuchungen wurde nachgewiesen, daß der ET_A-Rezeptor funktionell im humanen Myokard dominiert (Pönicke et al., 1998). Im Myokard von Patienten mit Herzinsuffizienz waren dabei keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu Spender-Myokard nachweisbar. In anderen Patientenkollektiven wurde eine erhöhte myokardiale ET_A-Expression bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie

beschrieben (Pieske et al., 1999). Diese Ergebnisse unterstützen die Daten einer erhöhten ET_A-Expression im Myokard von Patienten mit Herzinsuffizienz in der vorliegenden Arbeit (Morawietz et al., 2000a).

Die ET_A-Expression könnte in unterschiedlichen Zelltypen induziert sein. Während Endothelzellen keine ET_A-Rezeptoren exprimieren (Heinroth-Hoffmann et al., 1998), ist die ET-Rezeptorzahl in Myozyten höher, als in VSMC oder Fibroblasten (Dagassan et al., 1996; Fareh et al., 1996). Daher ist die ET_A-Expression wahrscheinlich vorrangig in den Kardiomyozyten bei Patienten mit Herzinsuffizienz erhöht. ET-1 stimuliert ET_A-vermittelt Hypertrophie, Kontraktilität und Proteinsynthese in Kardiomyozyten (Suzuki et al., 1990; Sugden et al., 1993). In tierexperimentellen Studien verbessert chronische ET-Rezeptorblockade die Myokardfunktion, verhinderte die progressive Ventrikeldilatation und verringerte die Mortalität in einem Infarkt-Modell (Fraccarollo et al., 1997; Sakai et al., 1996a). In hypertensiven Ratten verhinderte chronische ET_A-Rezeptorblockade blutdruckunabhängig die linksventrikuläre Hypertrophie (Ehmke et al., 1999). Darüber hinaus kann ET_A-Rezeptorblockade im transgenen hypertensiven Ratten-Modell die Herzfunktion und die Calciumaufnahme positiv beeinflussen (Rothermund et al., 2000). Da ACE-Hemmer-Therapie in der vorliegenden Arbeit die myokardiale ET_A-Expression nicht beeinflusst, könnte ein selektiver ET_A-Rezeptor-Blocker eine interessante neue therapeutische Option in der Behandlung der erhöhten ET_A-Expression bei Patienten mit Herzinsuffizienz sein.

Die ET_B-Rezeptor-mRNA-Expression war in der vorliegenden Arbeit im Vorhof bei Herzinsuffizienz erniedrigt, während im Ventrikel kein signifikanter Unterschied nachweisbar war. In unabhängigen Untersuchungen wurde eine verringerte ET_B-Rezeptordichte bei Herzinsuffizienz im Ventrikel gefunden (Zolk et al., 1999). In zwei weiteren Arbeiten war keine Unterschied in der ET_B-Rezeptordichte bei Herzinsuffizienz nachweisbar (Pönicke et al., 1998; Pieske et al., 1999). Die Erklärung für diese Unterschiede liegt wahrscheinlich in den unterschiedlichen Patientenkollektiven bzw. Variationen auf den verschiedenen Ebenen der Regulation der Genexpression und Rezeptoraktivität. In der Mehrzahl der Untersuchungen werden jedoch im insuffizienten Myokard die ET_A- im Verhältnis zu den ET_B-Rezeptoren vermehrt exprimiert. Dies kann neben den beschriebenen ET_A-Effekten auf Myokardfunktion und Hypertrophie eine lokal verringerte ET_B-vermittelte ET-1 "clearance" zur Folge haben, wodurch die ET_A-Wirkungen zusätzlich verstärkt werden.

5.3.3. Induktion der eNOS durch ACE-Hemmer-Therapie im Myokard von Patienten mit Herzinsuffizienz

Die beschriebene erhöhte myokardiale eNOS-Expression könnte zum kardioprotektiven Potenzial von ACE-Hemmer-Therapie beitragen. Dies kann durch direkte Ang II-Wirkungen vermittelt sein. Ang II hat jedoch keine direkten Effekt auf die eNOS-Expression in koronaren Endothelzellen. Kürzlich konnte von unserem Labor gezeigt werden, daß ACE-Hemmung die eNOS-Expression in der Aorta hypertensiver Tiere erhöht (Goetz and Holtz, 1999). Dieser Effekt wird durch parallele Behandlung mit einem Bradykinin-Rezeptor-Typ 2-Antagonisten gehemmt. Dies spricht für einen Bradykinin-vermittelten Mechanismus. Eine erhöhte eNOS-Aktivität wurde nach Bradykinin-Rezeptor-Typ 2-Stimulation und Phospholipase C-Aktivierung gezeigt (Mombouli, 1997). Da ACE neben der Ang II-Bildung auch den Bradykinin-Abbau katalysiert, können erhöhte Bradykinin-Spiegel durch ACE-Hemmer-Therapie zu der in dieser Arbeit beschriebenen Erhöhung der eNOS-Expression beitragen.

Die bisherigen Arbeiten zur myokardialen eNOS-Expression bei Herzinsuffizienz sind widersprüchlich (Drexler et al., 1998; Stein et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde eine tendenziell verringerte eNOS-Expression im insuffizienten Myokard gefunden, die jedoch keine Signifikanz erreichte. ACE-Hemmer-Therapie erhöhte dagegen die eNOS-Expression. Die Unterschiede in der Literatur könnten u.a. auf die unterschiedlichen Patientenkollektive und die Frequenz und Dosierung der ACE-Hemmer-Therapie zurückzuführen sein. Darüber hinaus können Variationen in der iNOS-Expression im terminal insuffizienten Herz über einen NO/cGMP-medierten negativen Rückkopplungsmechanismus die eNOS-Expression beeinflussen (Vaziri and Wang, 1999). Im Myokard eines Postinfarkt-Ratten-Modells wurde eine verringerte eNOS-Expression beschrieben, die durch ACE-Hemmer-Therapie normalisiert werden kann (Qi et al., 1999). Diese Autoren sahen dabei keinen Effekt einer ACE-Hemmung im normalen Myokard. Der positive Effekt der ACE-Hemmung wird daher möglicherweise erst im insuffizienten Myokard ausgeprägt.

Im Herz wird eNOS in endothelial ausgekleideten Abschnitten, in den mesothelialen Zellen des Epi- und Endokards und in den Kardiomyozyten exprimiert. Jeder genannte Zelltyp kann durch NO-Bildung die myokardiale und vaskuläre Funktion beeinflussen (Arstall and Kelly, 1999; Kojda and Kottenberg, 1999). Herzinsuffizienzpatienten haben eine gestörte Endothelfunktion in Koronargefäßen und peripheren Arterien. Eine verringerte NO-Verfügbarkeit könnte dabei eine wichtige Rolle spielen. Eine Erhöhung der eNOS-Expression durch ACE-Hemmer-Therapie kann daher funktionelle Relevanz durch eine verbesserte

vaskuläre Funktion der Koronargefäße, aber auch eine erhöhte myokardiale Kontraktilität und Mitochondrienfunktion in den Kardiomyozyten haben (Loke et al., 1999).

5.3.4. Regulation des ET-Systems bei mechanischer Entlastung durch ventrikuläre Assist-Systeme

Die mechanische Überlast scheint auch in der Progression der Herzinsuffizienz eine wichtige Rolle zu spielen. Die mechanische Entlastung des Myokards terminal herzinsuffizienter Patienten durch ventrikuläre Assist-Systeme führt in der vorliegenden Arbeit zu einer Normalisierung der erhöhten ET_A-Rezeptorexpression (Morawietz et al., 2000a). Die verringerte ET_A-Expression korreliert dabei nicht mit der Dauer der Entlastung, oder der verringerten Expression von ANP oder proapoptotischen Genen. Eine sekundäre Beeinflussung der Genexpression durch entzündliche Prozesse wurde durch eine unveränderte Expression von Markern einer inflammatorischen Infiltration während der VAD-Entlastung ausgeschlossen. Diese Daten sprechen für eine Schlüsselrolle der mechanischen Überlast bei der erhöhten ET_A-Expression im Myokard von Patienten mit Herzinsuffizienz.

Die verringerte ET_A-Expression könnte damit zum positiven Effekt der VAD-Therapie beitragen, die neben einer Überbrückung zur Herztransplantation in einigen Patienten eine anschließende Transplantation durch funktionelle Erholung des Myokards nicht mehr notwendig macht (Zerkowski et al., 2000).

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, molekulare Mechanismen der Ausbildung und Lokalisierung von atherosklerotischen Plaques durch biomechanische Kräfte (Schubspannung, Dehnung), lokal erhöhte Angiotensin II (Ang II)- bzw. Endothelin-1 (ET-1)-Konzentrationen, erhöhte Apoptoseraten, oxidativen Streß oder verstärkte Aufnahme von oxidativ modifiziertem Lipoprotein (oxLDL) in Gefäßzellen zu analysieren. Darüber hinaus wurde in tierexperimentellen und klinischen Studien der Einfluß einer Therapie mit Angiotensin-converting enzyme (ACE)-Hemmern, Ang II-Rezeptor Typ 1 (AT₁)-Antagonisten bzw. Cholesterinsyntheseenzym (CSE)-Hemmern auf die Expression von Genen untersucht, die in die Pathogenese von Atherosklerose und Herzinsuffizienz involviert sein könnten.

6.1. Biomechanische Regulation der Genexpression in Gefäßzellen

Die Regulation der Genexpression durch biomechanischen Kräfte wurde nach Applikation von Schubspannung auf humane Endothelzellen und von Dehnung auf glatte Muskelzellen analysiert.

In einem ersten Ansatz wurden Gene gesucht, die durch chronische arterielle oder venöse Schubspannung in Endothelzellen differenziell reguliert werden. Durch RAP-PCR-Amplifikation wurde ein Gen kloniert und molekular charakterisiert, das durch arterielle laminare Schubspannung differenziell herabreguliert wird. Dieses Gen kodiert das humane Homolog des β -tubulin folding cofactor D (tfcD). Die tfcD-Herabregulation durch arterielle Schubspannung erfolgt NO-abhängig. In weitergehenden Analysen wurde das humane tfcA-Gen kloniert, dessen Genprodukt sich bei der Tubulinfaltung mit dem tfcD-Protein im Gleichgewicht befindet. Die tfcA-, tfcE- und β -Tubulin-mRNA-Expression wird durch arterielle Schubspannung in humanen Endothelzellen herabreguliert. Dies erfolgt auf einem NO-unabhängigen Weg.

Die Bildung des proatherosklerotischen Vasokonstriktors ET-1 wird durch chronische laminare Schubspannung in Endothelzellen herabreguliert. Dies erfolgt auf der Ebene der Pre-Pro-Endothelin-1- und Endothelin-converting enzyme-1-mRNA, während parallel der Endothelin-Rezeptor B (ET_B) durch Schubspannung induziert wird. Die ET_B-Induktion ist als antiatherosklerotischer Schutzmechanismus zu werten, da ET_B-vermittelte NO-Freisetzung die Vasorelaxation steigert und die Blutplättchen-Aggregation hemmt. Am Beispiel des ET_B-

Rezeptors wurde parallel die zeit- und kostengünstigere Methode der mRNA-Quantifizierung durch serielle multistandard-assistierte RT-PCR (smaRT-PCR) entwickelt.

Arterielle laminare Schubspannung verringert die Apoptoserate von Endothelzellen durch Herabregulation proapoptotischer Gene (Fas) und Induktion antiapoptotischer Gene (FasExo6Del, Bcl-x_L, Mcl-1). Daneben werden jedoch auch potenziell proapoptotische Genprodukte (Bak, Bax) durch arterielle Schubspannung induziert. Die basale und schubspannungsabhängige Expression von pro- bzw. antiapoptotischen Genen ist in humanen Endothelzellen z.T. NO-abhängig.

Die biomechanische Regulation der Genexpression in Gefäßzellen kann durch Aktivierung bzw. Inaktivierung von Transkriptionsfaktoren vermittelt sein. Applikation von laminarer Schubspannung führt zur transienten Induktion der Transkriptionsfaktoren “Early growth response gene-1” (Egr-1) und “Activator protein-1” (AP-1). Diese Induktion erfolgt auf einem PKC- und ET_B-abhängigen Signalweg, in den z.T. NO involviert ist. Chronische Applikation von arterieller Schubspannung führt dagegen zu einer Herabregulation der Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1. Auch biomechanische Dehnung von vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC) bewirkt eine transiente Induktion der Egr-1- und c-jun-Expression. Bereits eine einzelne mechanische Deformation von 1 sec ist ausreichend, um eine transkriptionelle Induktion in VSMC auszulösen. Die Induktion beider Gene durch Dehnung erfolgt in Abhängigkeit von der extrazellulären Matrix. Darüber hinaus konnte eine dehnungsabhängige Translokation des Egr-1-Proteins vom perinukleären Raum in den Zellkern beobachtet werden, die typisch für eine Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors ist.

6.2. Induktion von Superoxidanionbildung und oxLDL-Aufnahme in Endothelzellen

Oxidativer Streß durch Superoxidanionbildung wird als proatherosklerotischer Risikofaktor angesehen. Nicht nur die Granulocyten besitzen die enzymatische Ausstattung zur Bildung von Superoxidanionen, sondern auch Endothelzellen exprimieren alle vier Untereinheiten (gp91phox, p22phox, p47phox und p67phox) einer superoxidanionbildenden NAD(P)H-Oxidase. Die NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit gp91phox wurde als limitierende Untereinheit der endotheliale Superoxidanionbildung identifiziert. ET-1 und Ang II induzieren dosisabhängig die mRNA-Expression von NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten und die funktionelle Superoxidanionbildung in Endothelzellen.

Darüber hinaus stimulieren Ang II (AT₁-Rezeptor-vermittelt) und ET-1 (ET_B-Rezeptor-vermittelt) die Aufnahme von proatherosklerotischen oxLDL in Endothelzellen durch Induktion des endothelialen oxLDL-Rezeptors LOX-1. Da oxLDL zusätzlich die NAD(P)H-

Oxidase und die Superoxidanionbildung stimuliert, kann ein proatherosklerotischer *Circulus vitiosus* aus ET-1- und Ang II-induzierter erhöhter Superoxidanionbildung, vermehrter oxLDL-Aufnahme und anschließender Potenzierung durch Generierung von oxidativem Streß postuliert werden.

Zusätzlich bewirkt Depolarisation eine vermehrte NAD(P)H-Oxidase-vermittelte Superoxidanionbildung in humanen Endothelzellen. Die Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase erfolgt dabei nicht auf mRNA-Ebene, sondern durch Tyrosinphosphorylierung und anschließende Membrantranslokation des kleinen G-Proteins Rac.

6.3. Klinische und tierexperimentelle Untersuchungen

Zunächst wurde in klinischen Studien analysiert, ob durch medikamentöse ACE-Hemmer-Therapie oder AT₁-Rezeptorblockade die gp91phox- oder die LOX-1-mRNA-Expression in *Arteria mammaria interna*-Biopsien von Patienten mit koronarer Herzkrankheit beeinflusst wird. Eine Behandlung mit ACE-Hemmern hatte in den verschriebenen Dosierungen in den untersuchten Patienten keinen Effekt auf die gp91phox-mRNA-Expression, führte jedoch zu einer Herabregulation der LOX-1-Expression. Medikamentöse Behandlung mit einem AT₁-Rezeptor-Blocker führte dagegen zu einer signifikanten Herabregulation der gp91phox-mRNA-Expression.

Präoperative Senkung der körpereigenen Cholesterinsynthese und des LDL-Spiegels durch medikamentöse CSE-Hemmer-Therapie senkt die gp91phox-Expression in arteriellen Biopsien von Patienten mit koronarer Herzkrankheit. Diese erfolgte unabhängig von einer Therapie mit ACE-Hemmern oder AT₁-Blockern. Die verringerte LOX-1- bzw. gp91phox-mRNA-Expression in *A. mammaria*-Biopsien von Patienten mit koronarer Herzkrankheit nach präoperativer medikamentöser Behandlung mit ACE-Hemmern, AT₁-Rezeptor-Blockern bzw. CSE-Hemmern spricht für ein antiatherosklerotisches Potenzial dieser primär antihypertensiven und antihypercholesterämischen Therapien.

Die Expression von Genen des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) und des Endothelin-Systems und eine potenzielle Wechselwirkung zwischen beiden Systemen wurde *in vivo* in tierexperimentellen und klinischen Studien untersucht.

In einem Maus-Modell führt Übergewicht durch fettreiche Ernährung zu einer Erhöhung der ACE-Aktivität und der ET-1-Gewebekonzentration in der Niere. Die Erhöhung der ACE-Aktivität wird durch zusätzliche Gabe eines ET_A-selektiven Rezeptorantagonisten verhindert. Die ACE-Herabregulation durch ET_A-Rezeptorblockade erfolgt jedoch nicht auf der Ebene

der ACE-mRNA-Expression. Diese Befunde sprechen für ein organprotektives Potenzial selektiver ET_A-Rezeptor-Blocker in der Niere.

In der Ratten-Aorta wurde eine altersabhängig erhöhte Pre-Pro-Endothelin-1-, eNOS- und iNOS-mRNA-Expression und ET-1-Peptid-Konzentration nachgewiesen.

In klinischen Untersuchungen wurde der Einfluß von ACE-Hemmer-Therapie auf die Expression von Genen des ET-Systems in *A. mammaria*-Biopsien von Patienten mit koronarer Herzkrankheit untersucht. Eine präoperative ACE-Hemmer-Therapie führt zu einer Herabregulation der ECE-1-mRNA-Expression im Vergleich zu Patienten ohne ACE-Hemmer. Die mRNA-Expression von Pre-Pro-Endothelin-1, dem ET_A- und dem ET_B-Rezeptor wird dagegen durch präoperative ACE-Hemmer-Therapie nicht beeinflusst.

Darüber hinaus wirkt ACE-Hemmer-Therapie kardioprotektiv durch Erhöhung der eNOS-Expression und die partielle Normalisierung der erhöhten ECE-1-Expression im Myokard von Patienten mit Herzinsuffizienz.

Darüber hinaus konnte eine Normalisierung der bei Herzinsuffizienz erhöhten linksventrikulären ET_A-Rezeptor-Expression durch mechanische Entlastung mit einem ventrikulären Assist-System (VAD) während der Überbrückungsperiode zur Herztransplantation gezeigt werden. Dies könnte zur Erholung der Myokard-Funktion durch VAD in Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz beitragen.

7. Literatur

1. 4S Group (1994). Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet*. 344:1383-1389.
2. Ackermann EJ, Taylor JK, Narayana R, Bennett CF (1999). The role of antiapoptotic Bcl-2 family members in endothelial apoptosis elucidated with antisense oligonucleotides. *J Biol Chem*. 274:11245-11252.
3. Akai Y, Homma T, Burns KD, Yasuda T, Badr KF, Harris RC (1994). Mechanical stretch/relaxation of cultured rat mesangial cells induces protooncogenes and cyclooxygenase. *Am J Physiol*. 267:C482-490.
4. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 215:403-410.
5. Ando K, Hirata Y, Shichiri M, Emori T, Marumo F (1989). Presence of immunoreactive endothelin in human plasma. *FEBS Lett*. 245:164-166.
6. Arcari P, Martinelli R, Salvatore F (1984). The complete sequence of a full length cDNA for human liver glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: evidence for multiple mRNA species. *Nucleic Acids Res*. 12:9179-9189.
7. Ardlie NG, Selley ML, Simons LA (1989). Platelet activation by oxidatively modified low density lipoproteins. *Atherosclerosis*. 76:117-124.
8. Arstall MA, Kelly RA (1999). The role of nitric oxide in heart failure. *Coron Artery Dis*. 10:301-308.
9. Asada S, Kasuya Y, Sakurai T, Masaki T, Goto K (1995). Endothelin-1-induced downregulation of ETB receptor mRNA: participation of cAMP. *J Cardiovasc Pharmacol*. 26:S272-275.
10. Auge N, Andrieu N, Negre-Salvayre A, Thiers JC, Levade T, Salvayre R (1996). The sphingomyelin-ceramide signaling pathway is involved in oxidized low density lipoprotein-induced cell proliferation. *J Biol Chem*. 271:19251-19255.
11. Bao X, Lu C, Frangos JA (1999). Temporal gradient in shear but not steady shear stress induces PDGF-A and MCP-1 expression in endothelial cells: role of NO, NF kappa B, and egr-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 19:996-1003.
12. Barber DA, Michener SR, Ziesmer SC, Miller VM (1996). Chronic increases in blood flow upregulate endothelin-B receptors in arterial smooth muscle. *Am J Physiol*. 270:H65-71.
13. Bartling B, Milting H, Schumann H, Darmer D, Arusoglu L, Koerner MM, El-Banayosy A, Koerfer R, Holtz J, Zerkowski HR (1999). Myocardial gene expression of regulators of myocyte apoptosis and myocyte calcium homeostasis during hemodynamic unloading by ventricular assist devices in patients with end-stage heart failure. *Circulation*. 100:II216-223.

14. Bartling B, Tostlebe H, Darmer D, Holtz J, Silber RE, Morawietz H (2000). Shear stress-dependent expression of apoptosis-regulating genes in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 278:740-746.
15. Barton M, Carmona R, Krieger JE, Goettsch W, Morawietz H, d'Uscio LV, Lattmann T, Luscher TF, Shaw S (2000a). Endothelin regulates angiotensin-converting enzyme in the mouse kidney. *J Cardiovasc Pharmacol.* 36:S244-247.
16. Barton M, Carmona R, Morawietz H, d'Uscio LV, Goettsch W, Hillen H, Haudenschild CC, Krieger JE, Munter K, Lattmann T, Luscher TF, Shaw S (2000b). Obesity is associated with tissue-specific activation of renal angiotensin-converting enzyme in vivo: evidence for a regulatory role of endothelin. *Hypertension.* 35:329-336.
17. Barton M, Cosentino F, Brandes RP, Moreau P, Shaw S, Luscher TF (1997). Anatomic heterogeneity of vascular aging: role of nitric oxide and endothelin. *Hypertension.* 30:817-824.
18. Barton M, Haudenschild CC, d'Uscio LV, Shaw S, Munter K, Luscher TF (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.
19. Baumbach GL (1991). Is pulse pressure a stimulus for altered vascular structure in chronic hypertension? *Hypertension.* 18:728-729.
20. Beny JL, Pacicca C (1994). Bidirectional electrical communication between smooth muscle and endothelial cells in the pig coronary artery. *Am J Physiol.* 266:H1465-1472.
21. Berry C, Hamilton CA, Brosnan MJ, Magill FG, Berg GA, McMurray JJ, Dominiczak AF (2000). Investigation into the sources of superoxide in human blood vessels: angiotensin II increases superoxide production in human internal mammary arteries. *Circulation.* 101:2206-2212.
22. Bhamidipati A, Lewis SA, Cowan NJ (2000). ADP ribosylation factor-like protein 2 (Arl2) regulates the interaction of tubulin-folding cofactor D with native tubulin. *J Cell Biol.* 149:1087-1096.
23. Biggers JD, McFeely RA (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.
24. Bishop C, Rankine DM, Talbott JH (1959). The nucleotides in normal human blood. *J. Biol. Chem.* 234:1233-1237.
25. Bohnemeier H, Pinto YM, Horkay F, Toth M, Juhasz-Nagy A, Orzechowski HD, Paul M (1998). Endothelin-converting enzyme-1 mRNA expression in human cardiovascular disease. *J Cardiovasc Pharmacol.* 31:S52-54.
26. Boulanger C, Luscher TF (1990). Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest.* 85:587-590.

27. Brown G, Albers JJ, Fisher LD, Schaefer SM, Lin JT, Kaplan C, Zhao XQ, Bisson BD, Fitzpatrick VF, Dodge HT (1990). Regression of coronary artery disease as a result of intensive lipid-lowering therapy in men with high levels of apolipoprotein B. *N Engl J Med.* 323:1289-1298.
28. Busse R, Fleming I (1998). Pulsatile stretch and shear stress: physical stimuli determining the production of endothelium-derived relaxing factors. *J Vasc Res.* 35:73-84.
29. Calle EE, Thun MJ, Petrelli JM, Rodriguez C, Heath CW, Jr. (1999). Body-mass index and mortality in a prospective cohort of U.S. adults. *N Engl J Med.* 341:1097-1105.
30. Cao XM, Koski RA, Gashler A, McKiernan M, Morris CF, Gaffney R, Hay RV, Sukhatme VP (1990). Identification and characterization of the Egr-1 gene product, a DNA-binding zinc finger protein induced by differentiation and growth signals. *Mol Cell Biol.* 10:1931-1939.
31. Caplan BA, Schwartz CJ (1973). Increased endothelial cell turnover in areas of in vivo Evans Blue uptake in the pig aorta. *Atherosclerosis.* 17:401-417.
32. Cascino I, Papoff G, De Maria R, Testi R, Ruberti G (1996). Fas/Apo-1 (CD95) receptor lacking the intracytoplasmic signaling domain protects tumor cells from Fas-mediated apoptosis. *J Immunol.* 156:13-17.
33. Cernadas MR, Sanchez de Miguel L, Garcia-Duran M, Gonzalez-Fernandez F, Millas I, Monton M, Rodrigo J, Rico L, Fernandez P, de Frutos T, Rodriguez-Feo JA, Guerra J, Caramelo C, Casado S, Lopez F (1998). Expression of constitutive and inducible nitric oxide synthases in the vascular wall of young and aging rats. *Circ Res.* 83:279-286.
34. Chai YC, Howe PH, DiCorleto PE, Chisolm GM (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.
35. Chen M, Kakutani M, Minami M, Kataoka H, Kume N, Narumiya S, Kita T, Masaki T, 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.
36. Cheng GC, Libby P, Grodzinsky AJ, Lee RT (1996). Induction of DNA synthesis by a single transient mechanical stimulus of human vascular smooth muscle cells. Role of fibroblast growth factor-2. *Circulation.* 93:99-105.
37. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry.* 18:5294-5299.
38. Chittenden T, Harrington EA, O'Connor R, Flemington C, Lutz RJ, Evan GI, Guild BC (1995). Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature.* 374:733-736.
39. Chiu JJ, Wung BS, Hsieh HJ, Lo LW, Wang DL (1999). Nitric oxide regulates shear stress-induced early growth response-1. Expression via the extracellular signal-regulated kinase pathway in endothelial cells. *Circ Res.* 85:238-246.

40. Clark RA, Volpp BD, Leidal KG, Nauseef WM (1990). Two cytosolic components of the human neutrophil respiratory burst oxidase translocate to the plasma membrane during cell activation. *J Clin Invest.* 85:714-721.
41. Cohn JN, Tognoni G, Glazer R, Spormann D, Val-HeFT. Io (2000). Baseline demographics of the valsartan heart failure trial. *Eur J Heart Fail.* 2:439-446.
42. Cowan NJ, Lewis SA (1999). A chaperone with a hydrophilic surface. *Nat Struct Biol.* 6:990-991.
43. Curnutte JT, Kuver R, Babior BM (1987). Activation of the respiratory burst oxidase in a fully soluble system from human neutrophils. *J Biol Chem.* 262:6450-6452.
44. Curran T, Franza BR, Jr. (1988). Fos and Jun: the AP-1 connection. *Cell.* 55:395-397.
45. Czapski G (1984). Reaction of .OH. *Methods Enzymol.* 105:209-215.
46. Dagassan PH, Breu V, Clozel M, Kunzli A, Vogt P, Turina M, Kiowski W, Clozel JP (1996). Up-regulation of endothelin-B receptors in atherosclerotic human coronary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol.* 27:147-153.
47. Davies PF, Barbee KA, Lal R, Robotewskyj A, Griem ML (1995). Hemodynamics and atherogenesis. Endothelial surface dynamics in flow signal transduction. *Ann N Y Acad Sci.* 748:86-102; discussion 102-103.
48. Davies PF, Barbee KA, Volin MV, Robotewskyj A, Chen J, Joseph L, Griem ML, Wernick MN, Jacobs E, Polacek DC, dePaola N, Barakat AI (1997). Spatial relationships in early signaling events of flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Annu Rev Physiol.* 59:527-549.
49. Dayhoff MO. 1978. Atlas of protein sequence and structure 5. suppl. 3. National Biomedical Research Foundation, Washington DC.
50. De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, Jr., Shin WS, Liao JK (1995). Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest.* 96:60-68.
51. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T (2000). International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev.* 52:415-472.
52. Del Maestro RF (1980). An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand Suppl.* 492:153-168.
53. Detmers PA, Hernandez M, Mudgett J, Hassing H, Burton C, Mundt S, Chun S, Fletcher D, Card DJ, Lisnock J, Weikel R, Bergstrom JD, Shevell DE, Hermanowski-Vosatka A, Sparrow CP, Chao YS, Rader DJ, Wright SD, Pure E (2000). Deficiency in inducible nitric oxide synthase results in reduced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Immunol.* 165:3430-3435.
54. Dewey CF, Jr., Bussolari SR, Gimbrone MA, Jr., Davies PF (1981). The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. *J Biomech Eng.* 103:177-185.

55. Diamond SL, Eskin SG, McIntire LV (1989). Fluid flow stimulates tissue plasminogen activator secretion by cultured human endothelial cells. *Science*. 243:1483-1485.
56. Dimmeler S, Haendeler J, Galle J, Zeiher AM (1997a). 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.
57. Dimmeler S, Haendeler J, Nehls M, Zeiher AM (1997b). Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1 β -converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J Exp Med*. 185:601-607.
58. Dimmeler S, Haendeler J, Rippmann V, Nehls M, Zeiher AM (1996). Shear stress inhibits apoptosis of human endothelial cells. *FEBS Lett*. 399:71-74.
59. Dimmeler S, Hermann C, Zeiher AM (1998). Apoptosis of endothelial cells. Contribution to the pathophysiology of atherosclerosis? *Eur Cytokine Netw*. 9:697-698.
60. Dimmeler S, Rippmann V, Weiland U, Haendeler J, Zeiher AM (1997c). Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide. *Circ Res*. 81:970-976.
61. Dinarello CA, Orkin SH, Brown R, Jesaitis AJ, Parkos CA (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.
62. Dong C, Wilson JE, Winters GL, McManus BM (1996). Human transplant coronary artery disease: pathological evidence for Fas-mediated apoptotic cytotoxicity in allograft arteriopathy. *Lab Invest*. 74:921-931.
63. Drake TA, Hannani K, Fei HH, Lavi S, Berliner JA (1991). Minimally oxidized low-density lipoprotein induces tissue factor expression in cultured human endothelial cells. *Am J Pathol*. 138:601-607.
64. Drexler H, Kastner S, Strobel A, Studer R, Brodde OE, Hasenfuss G (1998). Expression, activity and functional significance of inducible nitric oxide synthase in the failing human heart. *J Am Coll Cardiol*. 32:955-963.
65. Du W, Mills I, Sumpio BE (1995). Cyclic strain causes heterogeneous induction of transcription factors, AP-1, CRE binding protein and NF- κ B, in endothelial cells: species and vascular bed diversity. *J Biomech*. 28:1485-1491.
66. Duerschmidt N, Wippich N, Goettsch W, Broemme HJ, Morawietz H (2000). Endothelin-1 induces NAD(P)H oxidase in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 269:713-717.
67. Dusi S, Donini M, Rossi F (1995). Mechanisms of NADPH oxidase activation in human neutrophils: p67phox is required for the translocation of rac 1 but not of rac 2 from cytosol to the membranes. *Biochem J*. 308:991-994.
68. Edlund T, Walker MD, Barr PJ, Rutter WJ (1985). Cell-specific expression of the rat insulin gene: evidence for role of two distinct 5' flanking elements. *Science*. 230:912-916.

69. Ehmke H, Faulhaber J, Munter K, Kirchengast M, Wiesner RJ (1999). Chronic ETA receptor blockade attenuates cardiac hypertrophy independently of blood pressure effects in renovascular hypertensive rats. *Hypertension*. 33:954-960.
70. Eklund EA, Marshall M, Gibbs JB, Crean CD, Gabig TG (1991). Resolution of a low molecular weight G protein in neutrophil cytosol required for NADPH oxidase activation and reconstitution by recombinant Krev-1 protein. *J Biol Chem*. 266:13964-13970.
71. el Benna J, Ruedi JM, Babior BM (1994). Cytosolic guanine nucleotide-binding protein Rac2 operates in vivo as a component of the neutrophil respiratory burst oxidase. Transfer of Rac2 and the cytosolic oxidase components p47phox and p67phox to the submembranous actin cytoskeleton during oxidase activation. *J Biol Chem*. 269:6729-6734.
72. Ergul A, Walker CA, Goldberg A, Baicu SC, Hendrick JW, King MK, Spinale FG (2000). ET-1 in the myocardial interstitium: relation to myocyte ECE activity and expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 278:H2050-2056.
73. Fareh J, Touyz RM, Schiffrin EL, Thibault G (1996). Endothelin-1 and angiotensin II receptors in cells from rat hypertrophied heart. Receptor regulation and intracellular Ca²⁺ modulation. *Circ Res*. 78:302-311.
74. Farrow SN, White JH, Martinou I, Raven T, Pun KT, Grinham CJ, Martinou JC, Brown R (1995). Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature*. 374:731-733.
75. Finucane DM, Bossy-Wetzel E, Waterhouse NJ, Cotter TG, Green DR (1999). Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL. *J Biol Chem*. 274:2225-2233.
76. Flaherty JT, Pierce JE, Ferrans VJ, Patel DJ, Tucker WK, Fry DL (1972). Endothelial nuclear patterns in the canine arterial tree with particular reference to hemodynamic events. *Circ Res*. 30:23-33.
77. Flather MD, Yusuf S, Kober L, Pfeffer M, Hall A, Murray G, Torp-Pedersen C, Ball S, Pogue J, Moye L, 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.
78. Förster E (1994). An improved general method to generate internal standards for competitive PCR. *Biotechniques*. 16:18-20.
79. Förstermann U, Boissel JP, Kleinert H (1998). Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J*. 12:773-790.
80. Fraccarollo D, Hu K, Galuppo P, Gaudron P, Ertl G (1997). Chronic endothelin receptor blockade attenuates progressive ventricular dilation and improves cardiac function in rats with myocardial infarction: possible involvement of myocardial endothelin system in ventricular remodeling. *Circulation*. 96:3963-3973.

81. Frangos JA, Eskin SG, McIntire LV, Ives CL (1985). Flow effects on prostacyclin production by cultured human endothelial cells. *Science*. 227:1477-1479.
82. Frangos JA, McIntyre LV, Eskin SG (1988). Shear stress induced stimulation of mammalian cell metabolism. *Biotechnol. Bioeng.* 32:1053-1060.
83. Franke RP, Grafe M, Schnittler H, Seiffge D, Mittermayer C, Drenckhahn D (1984). Induction of human vascular endothelial stress fibres by fluid shear stress. *Nature*. 307:648-649.
84. Freeman BA, White CR, Gutierrez H, Paler-Martinez A, Tarpey MM, Rubbo H (1995). Oxygen radical-nitric oxide reactions in vascular diseases. *Adv Pharmacol.* 34:45-69.
85. Gabriel A, Kuddus RH, Rao AS, Watkins WD, Gandhi CR (1998). Superoxide-induced changes in endothelin (ET) receptors in hepatic stellate cells. *J Hepatol.* 29:614-627.
86. Galle J, Bengen J, Schollmeyer P, 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.
87. Galle J, Lehmann-Bodem C, Hubner U, Heinloth A, Wanner C (2000). CyA and OxLDL cause endothelial dysfunction in isolated arteries through endothelin-mediated stimulation of O₂⁻ formation. *Nephrol Dial Transplant*. 15:339-346.
88. Galle J, Schneider R, Heinloth A, Wanner C, Galle PR, Conzelmann E, Dimmeler S, Heermeier K (1999). Lp(a) and LDL induce apoptosis in human endothelial cells and in rabbit aorta: role of oxidative stress. *Kidney Int.* 55:1450-1461.
89. Galle J, Wanner C (1998). Oxidized LDL and Lp(a). Preparation, modification, and analysis. *Methods Mol Biol.* 108:119-130.
90. Garg UC, 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.
91. Gashler A, Sukhatme VP (1995). Early growth response protein 1 (Egr-1): prototype of a zinc-finger family of transcription factors. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 50:191-224.
92. Gimbrone MA, Jr., Topper JN, Nagel T, Anderson KR, Garcia-Cardena G (2000). Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 902:230-239.
93. Gius D, Cao XM, Rauscher FJd, Cohen DR, Curran T, Sukhatme VP (1990). Transcriptional activation and repression by Fos are independent functions: the C terminus represses immediate-early gene expression via CArG elements. *Mol Cell Biol.* 10:4243-4255.
94. Glagov S, Zarins C, Giddens DP, Ku DN (1988). Hemodynamics and atherosclerosis. Insights and perspectives gained from studies of human arteries. *Arch Pathol Lab Med.* 112:1018-1031.
95. Goettsch W, Lattmann T, Amann K, Szibor M, Morawietz H, Munter K, Muller SP, Shaw S, Barton M (2001). Increased expression of endothelin-1 and nitric oxide synthase isoform II in aging arteries. Implications for atherosclerosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 280:908-913.

96. Goetz RM, Holtz J (1999). Enhanced angiotensin-converting enzyme activity and impaired endothelium-dependent vasodilation in aortae from hypertensive rats: evidence for a causal link. *Clin Sci (Colch)*. 97:165-174.
97. Görlach A, Brandes RP, Nguyen K, Amidi M, Dehghani F, Busse R (2000). A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. *Circ Res*. 87:26-32.
98. Gorman CM, Merlino GT, Willingham MC, Pastan I, Howard BH (1982). The Rous sarcoma virus long terminal repeat is a strong promoter when introduced into a variety of eukaryotic cells by DNA-mediated transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 79:6777-6781.
99. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW (1994). Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 74:1141-1148.
100. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M (2000). NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 86:494-501.
101. Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S (1986). Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*. 320:454-456.
102. Guidelines Subcommittee (1999). 1999 World Health Organization-International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. *J Hypertens*. 17:151-183.
103. Gwinner W, Deters-Evers U, Brandes RP, Kubat B, Koch KM, Pape M, Olbricht CJ (1998). Antioxidant-oxidant balance in the glomerulus and proximal tubule of the rat kidney. *J Physiol (Lond)*. 509:599-606.
104. Hahn AW, Resink TJ, Scott-Burden T, Powell J, Dohi Y, Buhler FR (1990). Stimulation of endothelin mRNA and secretion in rat vascular smooth muscle cells: a novel autocrine function. *Cell Regul*. 1:649-659.
105. Heinloth A, Heermeier K, Raff U, Wanner C, Galle J (2000). Stimulation of NADPH oxidase by oxidized low-density lipoprotein induces proliferation of human vascular endothelial cells. *J Am Soc Nephrol*. 11:1819-1825.
106. Heinroth-Hoffmann I, Vogelsang M, Schiewe P, Morawietz H, Holtz J, Pönicke K, Brodde OE (1998). Mechanism of ET(A)-receptor stimulation-induced increases in intracellular Ca^{2+} in SK-N-MC cells. *Br J Pharmacol*. 125:1202-1211.
107. Hermann C, Zeiher AM, Dimmeler S (1997). Shear stress inhibits H_2O_2 -induced apoptosis of human endothelial cells by modulation of the glutathione redox cycle and nitric oxide synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 17:3588-3592.
108. Heyworth PG, Knaus UG, Settleman J, Curnutte JT, Bokoch GM (1993). Regulation of NADPH oxidase activity by Rac GTPase activating protein(s). *Mol Biol Cell*. 4:1217-1223.
109. Hilal-Dandan R, Merck DT, Lujan JP, Brunton LL (1994). Coupling of the type A endothelin receptor to multiple responses in adult rat cardiac myocytes. *Mol Pharmacol*. 45:1183-1190.

110. Hirata D, Masuda H, Eddison M, Toda T (1998). Essential role of tubulin-folding cofactor D in microtubule assembly and its association with microtubules in fission yeast. *EMBO J.* 17:658-666.
111. Hohler B, Holzapfel B, Kummer W (2000). NADPH oxidase subunits and superoxide production in porcine pulmonary artery endothelial cells. *Histochem Cell Biol.* 114:29-37.
112. Holmes DS, Quigley M (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem.* 114:193-197.
113. Holtz J, Goetz RM (1994). Vascular renin-angiotensin-system, endothelial function and atherosclerosis? *Basic Res Cardiol.* 89:71-86.
114. Hosoda K, Nakao K, Hiroshi A, Suga S, Ogawa Y, Mukoyama M, Shirakami G, Saito Y, Nakanishi S, Imura H (1991). Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA. *FEBS Lett.* 287:23-26.
115. Houston P, Dickson MC, Ludbrook V, White B, Schwachtgen JL, McVey JH, Mackman N, Reese JM, Gorman DG, Campbell C, Braddock M (1999). Fluid shear stress induction of the tissue factor promoter in vitro and in vivo is mediated by Egr-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19:281-289.
116. Huang A, Sun D, Kaley G, Koller A (1998). Superoxide released to high intra-arteriolar pressure reduces nitric oxide-mediated shear stress- and agonist-induced dilations. *Circ Res.* 83:960-965.
117. Huang J, Hitt ND, Kleinberg ME (1995). Stoichiometry of p22-phox and gp91-phox in phagocyte cytochrome b558. *Biochemistry.* 34:16753-16757.
118. Hutcheson IR, Griffith TM (1996). Mechanotransduction through the endothelial cytoskeleton: mediation of flow- but not agonist-induced EDRF release. *Br J Pharmacol.* 118:720-726.
119. Ichiki T, Labosky PA, Shiota C, Okuyama S, Imagawa Y, Fogo A, Niimura F, Ichikawa I, Hogan BL, Inagami T (1995). Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature.* 377:748-750.
120. Imai T, Hirata Y, Emori T, Yanagisawa M, Masaki T, Marumo F (1992). Induction of endothelin-1 gene by angiotensin and vasopressin in endothelial cells. *Hypertension.* 19:753-757.
121. Ingber DE (1997). Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction. *Annu Rev Physiol.* 59:575-599.
122. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T (1989). The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:2863-2867.
123. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest.* 52:2745-2756.

124. Jalali S, Li YS, Sotoudeh M, Yuan S, Li S, Chien S, Shyy JY (1998). Shear stress activates p60src-Ras-MAPK signaling pathways in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 18:227-234.
125. Jones PA, Scott-Burden T, Gevers W (1979). Glycoprotein, elastin, and collagen secretion by rat smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76:353-357.
126. Jones SA, O'Donnell VB, Wood JD, Broughton JP, Hughes EJ, Jones OT (1996). Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 271:H1626-1634.
127. Kahler J, Mendel S, Weckmuller J, Orzechowski HD, Mittmann C, Koster R, Paul M, Meinertz T, Munzel T (2000). Oxidative stress increases synthesis of big endothelin-1 by activation of the endothelin-1 promoter. *J Mol Cell Cardiol.* 32:1429-1437.
128. Kaiser D, Freyberg MA, Friedl P (1997). Lack of hemodynamic forces triggers apoptosis in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 231:586-590.
129. Kataoka H, Kume N, Minami M, Moriwaki H, Sawamura T, Masaki T, Kita T (2000). Expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 in human atherosclerotic lesions. *Ann N Y Acad Sci.* 902:328-335.
130. Kehrer JP (1993). Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol.* 23:21-48.
131. Kelly K, Cochran BH, Stiles CD, Leder P (1983). Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell.* 35:603-610.
132. Kessler P, Bauersachs J, Busse R, Schini-Kerth VB (1997). Inhibition of inducible nitric oxide synthase restores endothelium- dependent relaxations in proinflammatory mediator-induced blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17:1746-1755.
133. Khachigian LM, Anderson KR, Halnon NJ, Gimbrone MA, Jr., Resnick N, Collins T (1997). Egr-1 is activated in endothelial cells exposed to fluid shear stress and interacts with a novel shear-stress-response element in the PDGF A- chain promoter. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17:2280-2286.
134. Khachigian LM, Collins T (1997). Inducible expression of Egr-1-dependent genes. A paradigm of transcriptional activation in vascular endothelium. *Circ Res.* 81:457-461.
135. Khachigian LM, Lindner V, Williams AJ, Collins T (1996). Egr-1-induced endothelial gene expression: a common theme in vascular injury. *Science.* 271:1427-1431.
136. Khachigian LM, Resnick N, Gimbrone MA, Jr., Collins T (1995). Nuclear factor-kappa B interacts functionally with the platelet-derived growth factor B-chain shear-stress response element in vascular endothelial cells exposed to fluid shear stress. *J Clin Invest.* 96:1169-1175.
137. Khan BV, Harrison DG, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM (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 U S A.* 93:9114-9119.

138. Khan BV, Parthasarathy SS, Alexander RW, Medford RM (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.
139. Kharbanda S, Pandey P, Schofield L, Israels S, Roncinske R, Yoshida K, Bharti A, Yuan ZM, Saxena S, Weichselbaum R, Nalin C, Kufe D (1997). Role for Bcl-xL as an inhibitor of cytosolic cytochrome C accumulation in DNA damage-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:6939-6942.
140. Kiefer MC, Brauer MJ, Powers VC, Wu JJ, Umansky SR, Tomei LD, Barr PJ (1995). Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Nature.* 374:736-739.
141. Kim S, Iwao H (2000). Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev.* 52:11-34.
142. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science.* 275:1132-1136.
143. Kojda G, Kottenberg K (1999). Regulation of basal myocardial function by NO. *Cardiovasc Res.* 41:514-523.
144. Komuro I, Kurihara H, Sugiyama T, Yoshizumi M, Takaku F, Yazaki Y (1988). Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 238:249-252.
145. Korenaga R, Ando J, Kosaki K, Isshiki M, Takada Y, Kamiya A (1997). Negative transcriptional regulation of the VCAM-1 gene by fluid shear stress in murine endothelial cells. *Am J Physiol.* 273:C1506-1515.
146. Krauss RM, Winston M, Fletcher RN, Grundy SM (1998). Obesity: impact of cardiovascular disease. *Circulation.* 98:1472-1476.
147. Krzesz R, Wagner AH, Cattaruzza M, Hecker M (1999). Cytokine-inducible CD40 gene expression in vascular smooth muscle cells is mediated by nuclear factor kappaB and signal transducer and activation of transcription-1. *FEBS Lett.* 453:191-196.
148. Kuchan MJ, Frangos JA (1993). Shear stress regulates endothelin-1 release via protein kinase C and cGMP in cultured endothelial cells. *Am J Physiol.* 264:H150-156.
149. Kugiyama K, Kerns SA, Morrisett JD, Roberts R, Henry PD (1990). Impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by lysolecithin in modified low-density lipoproteins. *Nature.* 344:160-162.
150. Kume N, Murase T, Moriwaki H, Aoyama T, Sawamura T, Masaki T, Kita T (1998). Inducible expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells. *Circ Res.* 83:322-327.
151. Kurz S, Hink U, Nickenig G, Borthayre AB, Harrison DG, Munzel T (1999). Evidence for a causal role of the renin-angiotensin system in nitrate tolerance. *Circulation.* 99:3181-3187.

152. Lan Q, Mercurius KO, Davies PF (1994). Stimulation of transcription factors NF kappa B and AP1 in endothelial cells subjected to shear stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 201:950-956.
153. Lang D, Mosfer SI, Shakesby A, Donaldson F, Lewis MJ (2000). Coronary microvascular endothelial cell redox state in left ventricular hypertrophy : the role of angiotensin II. *Circ Res.* 86:463-469.
154. Lehr HA, Becker M, Marklund SL, Hubner C, Arfors KE, Kohlschutter A, Messmer K (1992). Superoxide-dependent stimulation of leukocyte adhesion by oxidatively modified LDL in vivo. *Arterioscler Thromb.* 12:824-829.
155. Lerman A, Edwards BS, Hallett JW, Heublein DM, Sandberg SM, Burnett JC, Jr. (1991). Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N Engl J Med.* 325:997-1001.
156. Lerman A, Holmes DR, Jr., Bell MR, Garratt KN, Nishimura RA, Burnett JC, Jr. (1995). Endothelin in coronary endothelial dysfunction and early atherosclerosis in humans. *Circulation.* 92:2426-2431.
157. Levesque MJ, Nerem RM (1985). The elongation and orientation of cultured endothelial cells in response to shear stress. *J Biomech Eng.* 107:341-347.
158. Lewis SA, Tian G, Vainberg IE, Cowan NJ (1996). Chaperonin-mediated folding of actin and tubulin. *J Cell Biol.* 132:1-4.
159. Li DY, Zhang YC, Philips MI, Sawamura T, Mehta JL (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.
160. Liersch M, Groteluschen H, Decker K (1971). NAD permeation into the liver cell. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 352:267-274.
161. Lin MC, Almus-Jacobs F, Chen HH, Parry GC, Mackman N, Shyy JY, Chien S (1997). Shear stress induction of the tissue factor gene. *J Clin Invest.* 99:737-744.
162. Liochev SI, Fridovich I (1997). Lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a mediator of superoxide anion production. *Arch Biochem Biophys.* 337:115-120.
163. LIPID Study Group (1998). Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. *N Engl J Med.* 339:1349-1357.
164. Loke KE, Laycock SK, Mital S, Wolin MS, Bernstein R, Oz M, Addonizio L, Kaley G, Hintze TH (1999). Nitric oxide modulates mitochondrial respiration in failing human heart. *Circulation.* 100:1291-1297.
165. Lucas M, Solano F (1992). Coelenterazine is a superoxide anion-sensitive chemiluminescent probe: its usefulness in the assay of respiratory burst in neutrophils. *Anal Biochem.* 206:273-7.
166. Lusis AJ (2000). Atherosclerosis. *Nature.* 407:233-241.

167. Malek A, Izumo S (1992). Physiological fluid shear stress causes downregulation of endothelin-1 mRNA in bovine aortic endothelium. *Am J Physiol.* 263:C389-396.
168. Malek AM, Greene AL, Izumo S (1993). Regulation of endothelin 1 gene by fluid shear stress is transcriptionally mediated and independent of protein kinase C and cAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:5999-6003.
169. Malek AM, Izumo S (1996). Mechanism of endothelial cell shape change and cytoskeletal remodeling in response to fluid shear stress. *J Cell Sci.* 109:713-726.
170. Marchenko SM, Sage SO (1994). Smooth muscle cells affect endothelial membrane potential in rat aorta. *Am J Physiol.* 267:H804-811.
171. Margulies KB, Hildebrand FL, Jr., Lerman A, Perrella MA, Burnett JC, Jr. (1990). Increased endothelin in experimental heart failure. *Circulation.* 82:2226-2230.
172. Martens JR, Gelband CH (1996). Alterations in rat interlobar artery membrane potential and K⁺ channels in genetic and nongenetic hypertension. *Circ Res.* 79:295-301.
173. Martin L, Fanarraga ML, Aloria K, Zabala JC (2000). Tubulin folding cofactor D is a microtubule destabilizing protein. *FEBS Lett.* 470:93-95.
174. Masaki T (2000). The endothelin family: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol.* 35(4):S3-5.
175. Meyer JW, Holland JA, Ziegler LM, Chang MM, Beebe G, Schmitt ME (1999). Identification of a functional leukocyte-type NADPH oxidase in human endothelial cells: a potential atherogenic source of reactive oxygen species. *Endothelium.* 7:11-22.
176. Miyauchi T, Masaki T (1999). Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol.* 61:391-415.
177. Mohan S, Mohan N, Sprague EA (1997). Differential activation of NF-kappa B in human aortic endothelial cells conditioned to specific flow environments. *Am J Physiol.* 273:C572-578.
178. Mohazzab KM, Kaminski PM, Wolin MS (1994). NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am J Physiol.* 266:H2568-2572.
179. Mohazzab KM, Wolin MS (1994). Properties of a superoxide anion-generating microsomal NADH oxidoreductase, a potential pulmonary artery PO₂ sensor. *Am J Physiol.* 267:L823-831.
180. Mombouli JV (1997). ACE inhibition, endothelial function and coronary artery lesions. Role of kinins and nitric oxide. *Drugs.* 54:12-22.
181. Morawietz H, Ma YH, Vives F, Wilson E, Sukhatme VP, Holtz J, Ives HE (1999a). Rapid induction and translocation of Egr-1 in response to mechanical strain in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 84:678-687.
182. Morawietz H, Rueckschloss U, Niemann B, Duerschmidt N, Galle J, Hakim K, Zerkowski HR, Sawamura T, Holtz J (1999b). Angiotensin II induces LOX-1, the human endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Circulation.* 100:899-902.
183. Morawietz H, Szibor M, Goettsch W, Bartling B, Barton M, Shaw S, Koerfer R, Zerkowski HR, Holtz J (2000a). Deloading of the left ventricle by ventricular assist device normalizes increased

- expression of endothelin ET(A) receptors but not endothelin-converting enzyme-1 in patients with end-stage heart failure. *Circulation*. 102:III188-193.
184. Morawietz H, Talanow R, Szibor M, Rueckschloss U, Schubert A, Bartling B, Darmer D, Holtz J (2000b). Regulation of the endothelin system by shear stress in human endothelial cells. *J Physiol (Lond)*. 525:761-770.
 185. Morey AK, Razandi M, Pedram A, Hu RM, Prins BA, Levin ER (1998). Oestrogen and progesterone inhibit the stimulated production of endothelin-1. *Biochem J*. 330:1097-1105.
 186. Morita T, Kurihara H, Maemura K, Yoshizumi M, Nagai R, Yazaki Y (1994). Role of Ca^{2+} and protein kinase C in shear stress-induced actin depolymerization and endothelin 1 gene expression. *Circ Res*. 75:630-636.
 187. Mullis KB, Faloona FA (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. 155:335-350.
 188. Munzenmaier DH, Greene AS (1996). Opposing actions of angiotensin II on microvascular growth and arterial blood pressure. *Hypertension*. 27:760-765.
 189. Murase T, Kume N, Korenaga R, Ando J, Sawamura T, Masaki T, Kita T (1998). Fluid shear stress transcriptionally induces lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells. *Circ Res*. 83:328-333.
 190. Nahmias C, Strosberg AD (1995). The angiotensin AT₂ receptor: searching for signal-transduction pathways and physiological function. *Trends Pharmacol Sci*. 16:223-225.
 191. Nishida K, Harrison DG, Navas JP, Fisher AA, Dockery SP, Uematsu M, Nerem RM, Alexander RW, Murphy TJ (1992). Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J Clin Invest*. 90:2092-2096.
 192. Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A, Lewis B (1992). Influx in vivo of low density, intermediate density, and very low density lipoproteins into aortic intimas of genetically hyperlipidemic rabbits. Roles of plasma concentrations, extent of aortic lesion, and lipoprotein particle size as determinants. *Arterioscler Thromb*. 12:6-18.
 193. Noris M, Morigi M, Donadelli R, Aiello S, Foppolo M, Todeschini M, Orisio S, Remuzzi G, Remuzzi A (1995). Nitric oxide synthesis by cultured endothelial cells is modulated by flow conditions. *Circ Res*. 76:536-543.
 194. Nunoi H, Rotrosen D, Gallin JI, Malech HL (1988). Two forms of autosomal chronic granulomatous disease lack distinct neutrophil cytosol factors. *Science*. 242:1298-1301.
 195. Ogawa Y, Nakao K, Arai H, Nakagawa O, Hosoda K, Suga S, Nakanishi S, Imura H (1991). Molecular cloning of a non-isopeptide-selective human endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 178:248-255.
 196. Ohno M, Cooke JP, Dzau VJ, Gibbons GH (1995). Fluid shear stress induces endothelial transforming growth factor beta- 1 transcription and production. Modulation by potassium channel blockade. *J Clin Invest*. 95:1363-1369.

197. Oka K, Sawamura T, Kikuta K, Itokawa S, Kume N, Kita T, Masaki T (1998). Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates phagocytosis of aged/apoptotic cells in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:9535-9540.
198. Orzechowski HD, Richter CM, Funke-Kaiser H, Kroger B, Schmidt M, Menzel S, Bohnemeier H, Paul M (1997). Evidence of alternative promoters directing isoform-specific expression of human endothelin-converting enzyme-1 mRNA in cultured endothelial cells. *J Mol Med*. 75:512-521.
199. Osol G (1995). Mechanotransduction by vascular smooth muscle. *J Vasc Res*. 32:275-292.
200. Packer M, Caspi A, Charlon V, Cohen-Solal A, Kiowski W, Kostuk W, Krum H, Levine B, Massie B, McMurray J, Rizzon P, Swedberg K (1998). Multicenter, double-blind, placebo-controlled study of long-term endothelin blockade with bosentan in chronic heart failure - results of the REACH-1 trial. *Circulation*. 98 (Supl.):I-3.
201. Pagano PJ, Clark JK, Cifuentes-Pagano ME, Clark SM, Callis GM, Quinn MT (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.
202. Pagano PJ, Ito Y, Tornheim K, Gallop PM, Tauber AI, Cohen RA (1995). An NADPH oxidase superoxide-generating system in the rabbit aorta. *Am J Physiol*. 268:H2274-2280.
203. Patino PJ, Rae J, Noack D, Erickson R, Ding J, de Olarte DG, Curnutte JT (1999). Molecular characterization of autosomal recessive chronic granulomatous disease caused by a defect of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form) oxidase component p67-phox. *Blood*. 94:2505-2514.
204. Peng HB, Libby P, Liao JK (1995). Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B. *J Biol Chem*. 270:14214-14219.
205. Pieske B, Beyermann B, Breu V, Löffler BM, Schlotthauer K, Maier LS, Schmidt-Schweda S, Just H, Hasenfuss G (1999). Functional effects of endothelin and regulation of endothelin receptors in isolated human nonfailing and failing myocardium. *Circulation*. 99:1802-1809.
206. Plumpton C, Ashby MJ, Kuc RE, O'Reilly G, Davenport AP (1996). Expression of endothelin peptides and mRNA in the human heart. *Clin Sci (Colch)*. 90:37-46.
207. Pohl U, Holtz J, Busse R, Bassenge E (1986). Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertension*. 8:37-44.
208. Pönicke K, Vogelsang M, Heinroth M, Becker K, Zolk O, Böhm M, Zerkowski HR, Brodde OE (1998). Endothelin receptors in the failing and nonfailing human heart. *Circulation*. 97:744-751.
209. Prasad A, Tupas-Habib T, Schenke WH, Mincemoyer R, Panza JA, Waclawin MA, Ellahham S, Quyyumi AA (2000). Acute and chronic angiotensin-1 receptor antagonism reverses endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 101:2349-2354.

210. Qi XL, Stewart DJ, Gosselin H, Azad A, Picard P, Andries L, Sys SU, Brutsaert DL, Rouleau JL (1999). Improvement of endocardial and vascular endothelial function on myocardial performance by captopril treatment in postinfarct rat hearts. *Circulation*. 100:1338-1345.
211. Quinn MT, Mullen ML, Jesaitis AJ (1992). Human neutrophil cytochrome b contains multiple hemes. Evidence for heme associated with both subunits. *J Biol Chem*. 267:7303-7309.
212. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S (1987). The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun*. 148:1482-1489.
213. Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG (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.
214. Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ (1990). Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature*. 344:254-257.
215. Ravel P, Lederer F (1993). Affinity-labeling of an NADPH-binding site on the heavy subunit of flavocytochrome b558 in particulate NADPH oxidase from activated human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*. 196:5435-52.
216. Reed JC (1996). Mechanisms of Bcl-2 family protein function and dysfunction in health and disease. *Behring Inst Mitt*:72-100.
217. Resnick N, Collins T, Atkinson W, Bonthron DT, Dewey CF, Jr., Gimbrone MA, Jr. (1993). Platelet-derived growth factor B chain promoter contains a cis-acting fluid shear-stress-responsive element. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:4591-4595.
218. Reusch HP, Chan G, Ives HE, Nemenoff RA (1997). Activation of JNK/SAPK and ERK by mechanical strain in vascular smooth muscle cells depends on extracellular matrix composition. *Biochem Biophys Res Commun*. 237:239-244.
219. Reusch P, Wagdy H, Reusch R, Wilson E, Ives HE (1996). Mechanical strain increases smooth muscle and decreases nonmuscle myosin expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 79:1046-1053.
220. Richardson BC, Lalwani ND, Johnson KJ, Marks RM (1994). Fas ligation triggers apoptosis in macrophages but not endothelial cells. *Eur J Immunol*. 24:2640-2645.
221. Ross R. 1992. The vessel wall. In *The heart and cardiovascular system: scientific foundations*. Fozzard HA, Haber E, Jennings RB, Katz AM, Morgan HE, editors. Raven Press, Ltd, New York, NY. 163-185.
222. Ross R (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 362:801-809.
223. Ross R (1999). Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 340:115-126.

224. Rothermund L, Pinto YM, Hocher B, Vetter R, Leggewie S, Kobetamehl P, Orzechowski HD, Kreutz R, Paul M (2000). Cardiac endothelin system impairs left ventricular function in renin-dependent hypertension via decreased sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} uptake. *Circulation*. 102:1582-1588.
225. Rotrosen D, Yeung CL, Leto TL, Malech HL, Kwong CH (1992). Cytochrome b558: the flavin-binding component of the phagocyte NADPH oxidase. *Science*. 256:1459-1462.
226. Royer-Pokora B, Kunkel LM, Monaco AP, Goff SC, Newburger PE, Baehner RL, Cole FS, Curnutte JT, Orkin SH (1986). Cloning the gene for an inherited human disorder-chronic granulomatous disease-on the basis of its chromosomal location. *Nature*. 322:32-38.
227. Ruiz-Torres P, Lucio J, Gonzalez-Rubio M, Rodriguez-Puyol M, Rodriguez-Puyol D (1997). Oxidant/antioxidant balance in isolated glomeruli and cultured mesangial cells. *Free Radic Biol Med*. 22:49-2256.
228. Ruoslahti E (1996). RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 12:697-715.
229. Rupprecht HD, Sukhatme VP, Lacy J, Sterzel RB, Coleman DL (1993). PDGF-induced Egr-1 expression in rat mesangial cells is mediated through upstream serum response elements. *Am J Physiol*. 265:F351-360.
230. Russell FD, Skepper JN, Davenport AP (1998). Human endothelial cell storage granules: a novel intracellular site for isoforms of the endothelin-converting enzyme. *Circ Res*. 83:314-321.
231. Ryder K, Nathans D (1988). Induction of protooncogene c-jun by serum growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85:8464-8467.
232. Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JM, Wun CC, Davis BR, Braunwald E (1996). The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med*. 335:1001-1009.
233. Sadoshima J, Izumo S (1993). Mechanical stretch rapidly activates multiple signal transduction pathways in cardiac myocytes: potential involvement of an autocrine/paracrine mechanism. *EMBO J*. 12:1681-1692.
234. Sadoshima J, Jahn L, Takahashi T, Kulik TJ, Izumo S (1992). Molecular characterization of the stretch-induced adaptation of cultured cardiac cells. An in vitro model of load-induced cardiac hypertrophy. *J Biol Chem*. 267:10551-10560.
235. Sakai S, Miyauchi T, Kobayashi M, Yamaguchi I, Goto K, Sugishita Y (1996a). Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure. *Nature*. 384:353-355.

236. Sakai S, Miyauchi T, Sakurai T, Kasuya Y, Ihara M, Yamaguchi I, Goto K, Sugishita Y (1996b). Endogenous endothelin-1 participates in the maintenance of cardiac function in rats with congestive heart failure. Marked increase in endothelin-1 production in the failing heart. *Circulation*. 93:1214-1222.
237. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor.
238. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 74:5463-5467.
239. Sata M, Suhara T, Walsh K (2000). Vascular endothelial cells and smooth muscle cells differ in expression of Fas and Fas ligand and in sensitivity to Fas ligand-induced cell death: implications for vascular disease and therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 20:309-316.
240. Sata M, Walsh K (1998). Oxidized LDL activates fas-mediated endothelial cell apoptosis. *J Clin Invest*. 102:1682-1689.
241. Sathyamoorthy M, de Mendez I, Adams AG, Leto TL (1997). p40(phox) down-regulates NADPH oxidase activity through interactions with its SH3 domain. *J Biol Chem*. 272:9141-9146.
242. Sattler M, Liang H, Nettesheim D, Meadows RP, Harlan JE, Eberstadt M, Yoon HS, Shuker SB, Chang BS, Minn AJ, Thompson CB, Fesik SW (1997). Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science*. 275:983-986.
243. Sawamura T, Kume N, Aoyama T, Moriwaki H, Hoshikawa H, Aiba Y, Tanaka T, Miwa S, Katsura Y, Kita T, Masaki T (1997). An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature*. 386:73-77.
244. Schmidt M, Kroger B, Jacob E, Seulberger H, Subkowski T, Otter R, Meyer T, Schmalzing G, Hillen H (1994). Molecular characterization of human and bovine endothelin converting enzyme (ECE-1). *FEBS Lett*. 356:238-243.
245. Schubert A, Cattaruzza M, Hecker M, Darmer D, Holtz J, Morawietz H (2000). Shear stress-dependent regulation of the human β -tubulin folding cofactor D gene. *Circ Res*. 87:1188-1194.
246. Schwachtgen JL, Houston P, Campbell C, Sukhatme V, Braddock M (1998). Fluid shear stress activation of egr-1 transcription in cultured human endothelial and epithelial cells is mediated via the extracellular signal-related kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Clin Invest*. 101:2540-2549.
247. Schweizer A, Valdenaire O, Nelböck P, Deutschle U, Dumas Milne Edwards JB, Stumpf JG, Löffler BM (1997). Human endothelin-converting enzyme (ECE-1): three isoforms with distinct subcellular localization. *Biochem J*. 328:871-877.
248. Sdougos HP, Bussolari SR, Dewey CFJ (1984). Secondary flow and turbulence in a cone-plate device. *J Fluid Mech*. 138:379-404.
249. Segal AW, Jones OT (1980). Rapid incorporation of the human neutrophil plasma membrane cytochrome b into phagocytic vacuoles. *Biochem Biophys Res Commun*. 92:710-715.

250. Segal AW, Jones OT, Webster D, Allison AC (1978). Absence of a newly described cytochrome b from neutrophils of patients with chronic granulomatous disease. *Lancet*. 2:446-449.
251. Segal AW, West I, Wientjes F, Nugent JH, Chavan AJ, Haley B, Garcia RC, Rosen H, Scrace G (1992). Cytochrome b-245 is a flavocytochrome containing FAD and the NADPH- binding site of the microbicidal oxidase of phagocytes. *Biochem J*. 284:781-788.
252. Segal AW, Jones OT (1978). Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles of human granulocytes. *Nature*. 276:515-517.
253. Sharefkin JB, Diamond SL, Eskin SG, McIntire LV, Dieffenbach CW (1991). Fluid flow decreases preproendothelin mRNA levels and suppresses endothelin-1 peptide release in cultured human endothelial cells. *J Vasc Surg*. 14:1-9.
254. Shaw G, Kamen R (1986). A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell*. 46:659-667.
255. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillop JH, Packard CJ (1995). Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med*. 333:1301-1307.
256. Shichiri M, Kato H, Marumo F, Hirata Y (1997). Endothelin-1 as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for endothelial cells. *Hypertension*. 30:1198-1203.
257. Shimada K, Matsushita Y, Wakabayashi K, Takahashi M, Matsubara A, Iijima Y, Tanzawa K (1995). Cloning and functional expression of human endothelin-converting enzyme cDNA. *Biochem Biophys Res Commun*. 207:807-812.
258. Shyy JY, Lin MC, Han J, Lu Y, Petrim M, Chien S (1995). The cis-acting phorbol ester "12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate"- responsive element is involved in shear stress-induced monocyte chemotactic protein 1 gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:8069-8073.
259. Smith RM, Connor JA, Chen LM, Babior BM (1996). The cytosolic subunit p67phox contains an NADPH-binding site that participates in catalysis by the leukocyte NADPH oxidase. *J Clin Invest*. 98:977-983.
260. Smith RM, Curnutte JT (1991). Molecular basis of chronic granulomatous disease. *Blood*. 77:673-686.
261. Sohn HY, Keller M, Gloe T, Morawietz H, Rueckschloss U, Pohl U (2000a). The small G-protein Rac mediates depolarization-induced superoxide formation in human endothelial cells. *J Biol Chem*. 275:18745-18750.
262. Sohn HY, Raff U, Hoffmann A, Gloe T, Heermeier K, Galle J, Pohl U (2000b). Differential role of angiotensin II receptor subtypes on endothelial superoxide formation. *Br J Pharmacol*. 131:667-672.

263. Stein B, Eschenhagen T, Rudiger J, Scholz H, Förstermann U, Gath I (1998). Increased expression of constitutive nitric oxide synthase III, but not inducible nitric oxide synthase II, in human heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 32:1179-1186.
264. Steinberg D (1997). Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation.* 95:1062-71.
265. Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS, Witztum JL, 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.
266. Stephan ZF, Yurachek EC (1993). Rapid fluorometric assay of LDL receptor activity by DiI-labeled LDL. *J Lipid Res.* 34:325-330.
267. Strawn WB, Chappell MC, Dean RH, Kivlighn S, Ferrario CM (2000). Inhibition of early atherogenesis by losartan in monkeys with diet- induced hypercholesterolemia. *Circulation.* 101:1586-1593.
268. Stula M, Orzechowski HD, Gschwend S, Vetter R, von Harsdorf R, Dietz R, Paul M (2000). Influence of sustained mechanical stress on Egr-1 mRNA expression in cultured human endothelial cells. *Mol Cell Biochem.* 210:101-108.
269. Sugden PH, Bogoyevitch MA (1996). Endothelin-1-Dependent Signaling Pathways in the Myocardium. *Trends in Cardiovascular Medicine.* 6:87-94.
270. Sugden PH, Fuller SJ, Mynett JR, Hatchett RJt, Bogoyevitch MA, Sugden MC (1993). Stimulation of adult rat ventricular myocyte protein synthesis and phosphoinositide hydrolysis by the endothelins. *Biochim Biophys Acta.* 1175:327-332.
271. Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB, Griendling KK, Lambeth JD (1999). Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature.* 401:79-82.
272. Suhara T, Fukuo K, Sugimoto T, Morimoto S, Nakahashi T, Hata S, Shimizu M, Ogihara T (1998). Hydrogen peroxide induces up-regulation of Fas in human endothelial cells. *J Immunol.* 160:4042-4047.
273. Sukhatme VP, Cao XM, Chang LC, Tsai-Morris CH, Stamenkovich D, Ferreira PC, Cohen DR, Edwards SA, Shows TB, Curran T, Le Beau MM, Adamson ED (1988). A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization. *Cell.* 53:37-43.
274. Suzuki T, Hoshi H, Mitsui Y (1990). Endothelin stimulates hypertrophy and contractility of neonatal rat cardiac myocytes in a serum-free medium. *FEBS Lett.* 268:149-151.
275. Szibor M, Morawietz H (2001). SmARt-PCR: a novel application of competitive PCR for mRNA quantitation. *Trends Genet Technical Tips Online.* (<http://research.bmn.com/tto/>):T002038.
276. Takada Y, Shinkai F, Kondo S, Yamamoto S, Tsuboi H, Korenaga R, Ando J (1994). Fluid shear stress increases the expression of thrombomodulin by cultured human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 205:1345-1352.

277. Takigawa M, Sakurai T, Kasuya Y, Abe Y, Masaki T, Goto K (1995). Molecular identification of guanine-nucleotide-binding regulatory proteins which couple to endothelin receptors. *Eur J Biochem.* 228:102-108.
278. Tarpey MM, White CR, Suarez E, Richardson G, Radi R, Freeman BA (1999). Chemiluminescent detection of oxidants in vascular tissue. Lucigenin but not coelenterazine enhances superoxide formation. *Circ Res.* 84:1203-1211.
279. Teahan C, Rowe P, Parker P, Totty N, Segal AW (1987). The X-linked chronic granulomatous disease gene codes for the beta- chain of cytochrome b-245. *Nature.* 327:720-721.
280. Tian G, Bhamidipati A, Cowan NJ, Lewis SA (1999). Tubulin folding cofactors as GTPase-activating proteins. GTP hydrolysis and the assembly of the alpha/beta-tubulin heterodimer. *J Biol Chem.* 274:24054-24058.
281. Tian G, Huang Y, Rommelaere H, Vandekerckhove J, Ampe C, Cowan NJ (1996). Pathway leading to correctly folded beta-tubulin. *Cell.* 86:287-296.
282. Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JA, Smith RD (1993). Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev.* 45:205-251.
283. Topper JN, Cai J, Falb D, Gimbrone MA, Jr. (1996). Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:10417-10422.
284. Traub O, Berk BC (1998). Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 18:677-685.
285. Tsai-Morris CH, Cao XM, Sukhatme VP (1988). 5' flanking sequence and genomic structure of Egr-1, a murine mitogen inducible zinc finger encoding gene. *Nucleic Acids Res.* 16:8835-8846.
286. Tsao PS, Buitrago R, Chan JR, Cooke JP (1996). Fluid flow inhibits endothelial adhesiveness. Nitric oxide and transcriptional regulation of VCAM-1. *Circulation.* 94:1682-1689.
287. Tsao PS, Wang B, Buitrago R, Shyy JY, Cooke JP (1997). Nitric oxide regulates monocyte chemotactic protein-1. *Circulation.* 96:934-940.
288. Tsutsumi Y, Matsubara H, Masaki H, Kurihara H, Murasawa S, Takai S, Miyazaki M, Nozawa Y, Ozono R, Nakagawa K, Miwa T, Kawada N, Mori Y, Shibasaki Y, Tanaka Y, Fujiyama S, Koyama Y, Fujiyama A, Takahashi H, Iwasaka T (1999). Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation. *J Clin Invest.* 104:925-935.
289. Turner AJ, Murphy LJ (1996). Molecular pharmacology of endothelin converting enzymes. *Biochem Pharmacol.* 51:91-102.

290. Uematsu M, Ohara Y, Navas JP, Nishida K, Murphy TJ, Alexander RW, Nerem RM, Harrison DG (1995). Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am J Physiol.* 269:C1371-1378.
291. Uhlinger DJ, Tyagi SR, Inge KL, Lambeth JD (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.
292. Unger T (1999). The angiotensin type 2 receptor: variations on an enigmatic theme. *J Hypertens.* 17:1775-1786.
293. Unger T, Chung O, Csikos T, Culman J, Gallinat S, Gohlke P, Hohle S, Meffert S, Stoll M, Stroth U, Zhu YZ (1996). Angiotensin receptors. *J Hypertens Suppl.* 14:S95-103.
294. Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK (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.
295. Valdenaire O, Rohrbacher E, Mattei MG (1995). Organization of the gene encoding the human endothelin-converting enzyme (ECE-1). *J Biol Chem.* 270:29794-29798.
296. Vasquez-Vivar J, Hogg N, Pritchard KA, Jr., Martasek P, Kalyanaraman B (1997). Superoxide anion formation from lucigenin: an electron spin resonance spin-trapping study. *FEBS Lett.* 403:127-130.
297. Vaziri ND, Wang XQ (1999). cGMP-mediated negative-feedback regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by nitric oxide. *Hypertension.* 34:1237-1241.
298. Virchow R. 1860. Cellular pathology as based upon physiological and pathological histology. Publ. Churchill, London, England.
299. Vogelsang M, Broede-Sitz A, Schäfer E, Zerkowski HR, Brodde OE (1994). Endothelin ETA-receptors couple to inositol phosphate formation and inhibition of adenylate cyclase in human right atrium. *J Cardiovasc Pharmacol.* 23:344-347.
300. Volpp BD, Nauseef WM, Clark RA (1988). Two cytosolic neutrophil oxidase components absent in autosomal chronic granulomatous disease. *Science.* 242:1295-1297.
301. von Rokitsansky C. 1852. The pathological anatomy of the organs of respiration and circulation. *In A Manual of Pathological Anatomy.* Vol. 4. Sydenham Society, Berlin. 261.
302. Wada H, Kaneko T, Wakita Y, Minamikawa K, Nagaya S, Tamaki S, Deguchi K, 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.
303. Wagner AH, Kohler T, Ruckschloss U, Just I, Hecker M (2000). Improvement of nitric oxide-dependent vasodilatation by HMG-CoA reductase inhibitors through attenuation of endothelial superoxide anion formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20:61-69.

304. Wallach TM, Segal AW (1996). Stoichiometry of the subunits of flavocytochrome b558 of the NADPH oxidase of phagocytes. *Biochem J.* 320:33-38.
305. Wang AM, Doyle MV, Mark DF (1989). Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:9717-9721.
306. Wang X, Studzinski GP (1997). Antiapoptotic action of 1,25-dihydroxyvitamin D3 is associated with increased mitochondrial MCL-1 and RAF-1 proteins and reduced release of cytochrome c. *Exp Cell Res.* 235:210-217.
307. Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, Macharzina R, Brasen JH, Skatchkov M, Heitzer T, Stasch JP, Griendling KK, Harrison DG, Bohm M, Meinertz T, Munzel T (1999). Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin- angiotensin system. *Circulation.* 99:2027-2033.
308. Webb DJ, Monge JC, Rabelink TJ, Yanagisawa M (1998). Endothelin: new discoveries and rapid progress in the clinic. *Trends Pharmacol Sci.* 19:5-8.
309. Weir MR, Dzau VJ (1999). The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management. *Am J Hypertens.* 12:205S-213S.
310. Wilson E, Mai Q, Sudhir K, Weiss RH, Ives HE (1993). Mechanical strain induces growth of vascular smooth muscle cells via autocrine action of PDGF. *J Cell Biol.* 123:741-747.
311. Wilson E, Sudhir K, Ives HE (1995). Mechanical strain of rat vascular smooth muscle cells is sensed by specific extracellular matrix/integrin interactions. *J Clin Invest.* 96:2364-2372.
312. Wilson E, Vives F, Collins T, Ives HE (1998). Strain-responsive regions in the platelet-derived growth factor-A gene promoter. *Hypertension.* 31:170-175.
313. Witztum JL, Steinberg D (1991). Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest.* 88:1785-1792.
314. Wolin MS (1996). Reactive oxygen species and vascular signal transduction mechanisms. *Microcirculation.* 3:1-17.
315. Wong AJ, Pollard TD, Herman IM (1983). Actin filament stress fibers in vascular endothelial cells in vivo. *Science.* 219:867-869.
316. Xu D, Emoto N, Giaid A, Slaughter C, Kaw S, deWit D, Yanagisawa M (1994). ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell.* 78:473-485.
317. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* 332:411-415.
318. Yoshida H, Quehenberger O, Kondratenko N, Green S, Steinberg D (1998). Minimally oxidized low-density lipoprotein increases expression of scavenger receptor A, CD36, and macroscialin in resident mouse peritoneal macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 18:794-802.

319. Yoshizumi M, Kurihara H, Sugiyama T, Takaku F, Yanagisawa M, Masaki T, Yazaki Y (1989). Hemodynamic shear stress stimulates endothelin production by cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 161:859-864.
320. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G (2000). Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med.* 342:145-153.
321. Zeiher AM, Drexler H, Saurbier B, Just H (1993). Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans. Effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia, and hypertension. *J Clin Invest.* 92:652-662.
322. Zerkowski HR, Grapow MT, Todorov A, Morawietz H (2000). "Reverse remodeling" durch Chirurgie induzierbar? *Z Kardiol.* 89:76-84.
323. Zhang H, Schmeisser A, Garlichs CD, Plotze K, Damme U, Mugge A, Daniel WG (1999). Angiotensin II-induced superoxide anion generation in human vascular endothelial cells: role of membrane-bound NADH-/NADPH-oxidases. *Cardiovasc Res.* 44:215-222.
324. Zolk O, Quatteck J, Sitzler G, Schrader T, Nickenig G, Schnabel P, Shimada K, Takahashi M, Bohm M (1999). Expression of endothelin-1, endothelin-converting enzyme, and endothelin receptors in chronic heart failure. *Circulation.* 99:2118-2123.

8. Anhang

8.1. Lebenslauf

Name:	Dr. Henning Morawietz
Geburtstag, Geburtsort:	03. November 1961 in Thale/Harz
Familienstand:	verheiratet seit 1987, 2 Kinder
Schulbildung:	8 Jahre Polytechnische Oberschule (Blankenburg/Harz, Suhl) 4 Jahre Erweiterte Oberschule (Halle-Neustadt) - Abitur (1,0)
Wehrdienst:	November 1980 - April 1982
Berufsausbildung:	5jähriges Studium der Biologie, Fachrichtung Genetik, an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Diplom 1987 mit "sehr gut". 3jähriges Forschungsstudium am Wissenschaftsbereich Genetik der Martin-Luther-Universität mit einjährigem UNESCO-Kurs für Molekularbiologie am Biologischen Forschungszentrum Szeged 1988/89, Promotion A zum Dr. rer. nat. 1990 mit "magna cum laude".
Berufstätigkeit:	März 1990 - Februar 1994 befristeter Assistent am Institut für Genetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Arbeitsaufenthalte an den Universitäten Köln und Genf. Seit März 1994 Arbeitsgruppenleiter am Institut für Pathophysiologie (Direktor: Prof. Dr. med. J. Holtz) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (seit März 2000 C1-Stelle). 1995/96 einjähriger Forschungsaufenthalt als DAAD-Stipendiat am Cardiovascular Research Institute der University of California, San Francisco.
Stipendien, Forschungspreise	1988 UNESCO-Stipendium am Biologischen Forschungszentrum Szeged 1989 Forschungspreis, Klasse I der MLU Halle-Wittenberg 1995 DAAD-Stipendium an der University of California, San Francisco 1998 Nachwuchspreis der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie-Herz- und Kreislaufforschung (Oskar-Lapp-Preis) (Seniorautor) 1998 Rudolf-Thauer-Posterpreis der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie-Herz- und Kreislaufforschung (Seniorautor) 1998 Forschungspreis der Novartis-Stiftung für therapeutische Forschung

Halle/S., den 31. Januar 2001

8.2. Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Habilitationsschrift selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Ein Habilitationsverfahren wurde bislang an einer anderen Universität weder eröffnet noch beantragt. Frühere Habilitationsverfahren an der Martin-Luther-Universität sind meinerseits nicht unternommen worden.

Halle (Saale), den 31. Januar 2001

Dr. Henning Morawietz

8.3. Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich bei der Erarbeitung der Habilitationsschrift unterstützt haben!

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. J. Holtz, dem Direktor des Institutes für Pathophysiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für die ständige Unterstützung meiner Arbeit, die konstruktiven Diskussionen und die gewährten kreativen Freiräume!

Ich möchte mich herzlich bei Prof. Dr. G. Reuter vom Institut für Genetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und Prof. Dr. med. H. E. Ives vom Cardiovascular Research Institute der University of California, San Francisco, bedanken, die maßgeblich mein Interesse für die genetische und kardiovaskuläre Grundlagenforschung geprägt haben.

Mein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe Andreas Schubert, Uwe Rückschloß, Marten Szibor, Nicole Dürrschmidt, Winfried Göttisch, Roland Talanow, Bernd Niemann, Frau Heinze und Frau Gall für Ihre engagierte Arbeit und das gute Arbeitsklima!

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Dr. Dorothea Darmer und den Mitarbeitern des Institutes für Pathophysiologie Babett Bartling, Roland Busath, Frau Heinke, Susanne Rohrbach, Eyk Schellenberger, Heike und Mike Tostlebe für die erwiesene Unterstützung bedanken!

Mein Dank gilt Prof. Dr. Pauer, PD Dr. Kaltenborn, Michael Schultz, Herrn Lehnig und Herrn Barowsky, sowie PD Dr. Hans-Jürgen Brömme und Nico Wippich für ihre Unterstützung bei der Etablierung der Plattenkegel-Apparatur und von Techniken zur Quantifizierung von Superoxidanionen!

Ich möchte mich bei dem Direktor des Julius-Bernstein-Institutes für Physiologie, Prof. Dr. med. Isenberg, dem Direktor des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie, Prof. Dr. Brodde, und ihren Mitarbeitern für die erwiesene Unterstützung bedanken!

Darüber hinaus möchte ich mich bei den Leitern der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie, Prof. Dr. med. Zerkowski und Prof. Dr. med. Silber, und ihren Mitarbeitern, sowie bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Kreissaals der Klinik für Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin der Martin-Luther-Universität, des St. Barbara-Krankenhauses und des Krankenhauses Martha-Maria Halle-Dölau für die Unterstützung unserer Arbeit bedanken!

Mein besonderer Dank gilt meinen Kooperationspartnern PD Dr. med. Matthias Barton (Kantonsspital Zürich), PD Dr. med. Jan Galle (Universität Würzburg), Prof. Dr. Markus Hecker (Georg-August-Universität Göttingen), PD Dr. Georg Kojda (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf), PD Dr. med. Thomas Münzel (Universität Hamburg), Prof. Dr. T. Sawamura (National Cardiovascular Research Institute Osaka), Dr. Hae-Young Sohn und Prof. Dr. med. Pohl (Ludwig-Maximilians-Universität München), und Frau Prof. Dr. Emily Wilson (Texas A&M, College Station, TX)!

Besonders herzlich möchte ich mich schließlich bei meiner Frau und meiner Familie für das Verständnis und die Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit bedanken!

8.4. Thesen

1. Die Atherosklerose nimmt eine Schlüsselstellung in der Pathogenese von Herz-Kreislaufkrankungen ein, da mit der Progression dieser Krankheit das Risiko für Bluthochdruck, koronare Herzkrankheit und Herzinfarkt steigt. Die molekularen Mechanismen der Entstehung und Lokalisierung von atherosklerotischen Plaques sind jedoch noch unvollständig verstanden.
2. Die Atherosklerose-Prädilektionstellen sind im Gefäßsystem durch lokal veränderte biomechanische Kräfte (niedrige Schubspannung, hohe Dehnung) gekennzeichnet.
3. In der vorliegenden Arbeit wurde daher in Gefäßzellen auf molekularer Ebene der Einfluß von biomechanischen Kräften (Schubspannung, Dehnung), lokal erhöhten Angiotensin II (Ang II)- bzw. Endothelin-1 (ET-1)-Konzentrationen, erhöhter Apoptose, oxidativem Streß und verstärkter Aufnahme von oxidativ modifiziertem Low-Density-Lipoprotein (oxLDL) untersucht. Damit sollten neue Einsichten in die Mechanismen der Ausbildung und Lokalisierung von atherosklerotischen Plaques gewonnen werden.
4. Die in der Gefäßwand *in vivo* wirkenden biomechanischen Kräfte können in kultivierten Gefäßzellen *in vitro* mit Hilfe eines Plattenkegel-Viskometers (Schubspannung) bzw. der zyklischen Applikation eines Vakuums auf elastische Membranen (Dehnung) simuliert werden.
5. Mit der Methode der “RNA arbitrarily primed”-Polymerasekettenreaktion (RAP-PCR) wurden Gene gesucht, die differenziell durch arterielle oder venöse Schubspannung in humanen Endothelzellen exprimiert werden. Die in dieser Arbeit initial identifizierten 30 RAP-PCR-Fragmente erlauben jedoch keine Abschätzung der Gesamtzahl an Genen, die durch diese unterschiedlichen biomechanischen Stimuli differenziell reguliert werden.
6. Das identifizierte “shear stress downregulated gene-1” kodiert das humane Homolog des “ β -tubulin folding cofactor D” (tfcD). Die NO-abhängige Herabregulation der tfcD-Expression durch arterielle Schubspannung spricht für eine neue Rolle von NO als Signalmolekül in der NO-abhängigen Regulation des Zytoskeletts durch biomechanische Kräfte.

7. Die Bildung des proatherosklerotischen Vasokonstriktors ET-1 wird durch laminare Schubspannung in Endothelzellen herabreguliert, während parallel der auf Endothelzellen vorherrschende Endothelin-Rezeptor B durch Schubspannung induziert wird. Diese Mechanismen können zum antiatherosklerotischen Potenzial von arterieller laminarer Schubspannung beitragen.
8. Die Apoptoserate von Endothelzellen wird durch arterielle laminare Schubspannung infolge der Herabregulation proapoptotischer Gene (Fas) und der Induktion antiapoptotischer Gene (FasExo6Del, Bcl-x_L) verringert. Damit könnte der erhöhte “turnover” von Endothelzellen an den Atherosklerose-Prädilektionsstellen und die endothelprotektive Wirkung von laminarer Schubspannung erklärt werden.
9. Die Induktion der Transkriptionsfaktoren “Early growth response gene-1” (Egr-1) und “Activator protein-1” (AP-1) durch biomechanische Kräfte kann die Genexpression in Gefäßzellen regulieren.
10. Oxidativer Streß durch Superoxidanionbildung wird als proatherosklerotischer Risikofaktor angesehen. Nicht nur in den Makrophagen als Zellen der Immunabwehr, sondern auch in den Endothelzellen konnte in dieser Arbeit die superoxidanionbildende NAD(P)H-Oxidase nachgewiesen werden. Da die mRNA der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit gp91phox von allen vier Untereinheiten am niedrigsten exprimiert wird, kann gp91phox die endotheliale Superoxidanionbildung limitieren.
11. ET-1 und Ang II induzieren dosisabhängig die NAD(P)H-Oxidase-Expression und die funktionelle Superoxidanionbildung. Darüber hinaus stimulieren ET-1 und Ang II die Aufnahme des proatherosklerotischen oxLDL in Endothelzellen durch Induktion des oxLDL-Rezeptors LOX-1. Da oxLDL die NAD(P)H-Oxidase und die Superoxidanionbildung stimuliert, kann ein proatherosklerotischer *Circulus vitiosus* aus ET-1- und Ang II-induzierter Superoxidanionbildung, vermehrter oxLDL-Aufnahme und anschließender Potenzierung durch oxidativem Streß postuliert werden.

12. Die verringerte LOX-1- bzw. gp91phox-mRNA-Expression in *Arteria mammaria interna*-Biopsien von Patienten mit koronarer Herzkrankheit nach präoperativer medikamentöser Behandlung mit Angiotensin-converting enzyme (ACE)-Hemmern, Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 (AT₁)-Blockern bzw. Cholesterinsyntheseenzym-Hemmern spricht für ein anti-atherosklerotisches Potenzial dieser primär antihypertensiven und antihypercholesterämischen Therapien.

13. Die gezeigte Erhöhung der Expression der endothelialen NO-Synthase und die partielle Normalisierung der erhöhten Endothelin-converting enzyme-1-Expression im Myokard kann zum kardioprotektiven Potenzial und der verbesserten Prognose durch ACE-Hemmer-Therapie bei Patienten mit Herzinsuffizienz beitragen.

14. Mechanische Entlastung des insuffizienten Myokards durch ventrikuläre Assist-Systeme (VAD) kann die im Vergleich zum Spender-Myokard erhöhte Endothelin-Rezeptor A-Expression in Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz normalisieren. Dieser Mechanismus trägt zum positiven Effekt der VAD-Therapie bei, die neben der Überbrückung zur Herztransplantation in einigen Patienten durch funktionelle Erholung des Myokards eine anschließende Transplantation nicht mehr notwendig macht.