

**Regulation von vasoaktiven Peptiden und Mediatoren der
Gefäßbildung durch kardiovaskuläre Risikofaktoren und
biomechanische Kräfte**



Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Winfried Götsch
geboren am 19. Dezember 1968
in Hildesheim

Gutachter:

1. Prof. Dr. R. Rudolph, Halle/Saale
2. Prof. Dr. J. Holtz, Halle/Saale
3. Prof. Dr. H.-J. Schnittler, Dresden

Halle (Saale), den 27.11.2002

(Verteidigung am 27. März 2003, Halle/Saale)

urn:nbn:de:gbv:3-000004867

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000004867>]

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
1.1 Endothelin	3
1.2 Endothelin-Konvertierungs-Enzyme	7
1.3 Das vaskuläre System – Entwicklung, Aufbau und Funktion	10
1.4 Das Ephrin/Eph-System	12
1.5 Das Angiopoietin/Tie-System	14
2. Material und Methoden	16
2.1 Chemikalien	16
2.1.1 Zellkulturprodukte	17
2.1.2 Zellkulturmedien	18
2.1.3 Puffer und Lösungen	19
2.2 Methoden	22
2.2.1 Kultivierung humaner Endothelzellen	22
2.2.2 Applikation von Schubspannung auf Endothelzellen	23
2.2.3 RNA-Präparation	24
2.2.3.1 RNA-Präparation von Gewebeproben mittels CsCl-Methode	24
2.2.3.2 RNA-Präparation von Zellkulturen mittels TriReagent™ (Sigma)	24
2.2.4 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration durch Absorption	25
2.2.5 Reverse Transkription	25
2.2.6 Polymerasekettenreaktion	26
2.2.7 Agarose-Gel-Elektrophorese	26
2.2.8 Elution von Nukleinsäuren	28
2.2.9 Klonierung von DNA-Fragmenten	28
2.2.10 Plasmid-DNA-Präparation	28
2.2.11 DNA-Sequenzierung	29
2.2.12 Transkriptionsfaktoranalyse mittels EMSA (electrophoretic mobility shift assay)	29
2.2.12.1 Präparation der Kernextrakte	29
2.2.12.2 Herstellung von radioaktiv markierten Oligonukleotid Proben	30
2.2.12.3 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)	31
2.2.13 <i>in situ</i> -Hybridisierung (ISH)	32
2.2.14 Proteinpräparation	34
2.2.15 Western-Analyse	34
2.2.16 Statistik	34

3. Ergebnisse	35
3.1 Einfluss von Angiotensin II auf die Expression von ECE-1-Isoformen	35
3.2 Einfluss von Angiotensin II auf die Endothelin-1-Peptid-Bildung in HUVEC	37
3.3 Einfluss von Angiotensin II auf das Endothelin-System in HCAEC	38
3.4 Untersuchungen zu Risikofaktoren der Arteriosklerose in Tiermodellen	
– Auswirkungen auf das Endothelin-System	38
3.4.1 Übergewicht aktiviert gewebespezifisch das Angiotensin-Konvertierungs-Enzym (ACE) ohne dessen mRNA-Expression zu beeinflussen	39
3.4.2 Erhöhte Expression von Endothelin-1 in Arterien alter Tiere	40
3.4.3 Erhöhte Expression von Endothelin-Rezeptor A und B in Erythropoietin-überexprimierenden Mäusen	41
3.5 Untersuchungen zum Endothelin-System im humanen Myokard	42
3.6 Expression der ECE-1-Isoformen in der <i>Arteria mammaria interna</i> von Patienten mit koronarer Herzkrankheit	44
3.7 Expression des Ephrin/Eph-Systems in unterschiedlichen Endothelzellen und glatten Muskelzellen	46
3.8 Nachweis der Ephrin-B2-Expression in adulten humanen Geweben durch <i>in situ</i> -Hybridisierung	47
3.9 Adhäsion und Wachstum von Endothelzellen auf EphB4-Fc bzw. Ephrin-B2-Fc-beschichteten Zellkulturschalen	49
3.10 Regulation des Ephrin/Eph-Systems durch Schubspannung in Endothelzellen (HUVEC)	51
3.10.1 Zeit- und Dosisabhängigkeit der Ephrin-B2- / EphB4-Expression	51
3.10.2 Ephrin-B2- / EphB4-Expression in HUVEC nach Schubspannung auf unterschiedlichen extrazellulären Matrices	53
3.10.3 Einfluss von Proteinkinaseinhibitoren auf die Regulation der Ephrin-B2- / EphB4-Expression in HUVEC nach Schubspannung	54
3.10.4 Regulation des Ephrin/Eph-Systems durch Schubspannung in Endothelzellen unterschiedlicher Gefäße (HUVEC, HUAEC, HCAEC)	55
3.11 Regulation des Angiopoietin/Tie-Systems durch Schubspannung in Endothelzellen (HUVEC)	56
3.11.1 Zeit- und Dosisabhängigkeit der Angiopoietin-2- / Tie2-Expression	56
3.11.2 Angiopoietin-2-Proteinexpression in HUVEC nach Schubspannung	58
3.11.3 Angiopoietin-2- / Tie2-Expression in HUVEC nach Schubspannung auf unterschiedlichen extrazellulären Matrices	59
3.11.4 Einfluss von Proteinkinaseinhibitoren auf die Regulation der Angiopoietin-2- / Tie2-Expression in HUVEC nach Schubspannung	60
3.11.5 Regulation des Angiopoietin/Tie-Systems durch Schubspannung in Endothelzellen unterschiedlicher Gefäße (HUVEC, HUAEC, HCAEC)	61
3.12 Regulation von Transkriptionsfaktoren durch Schubspannung in Endothelzellen (HUVEC)	62
4. Diskussion	64
4.1 Regulation von vasoaktiven Peptiden durch kardiovaskuläre Risikofaktoren	64
4.2 Regulation von Mediatoren der Gefäßbildung durch biomechanische Kräfte	73
5. Zusammenfassung	79
6. Literatur	82
7. Anhang	

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE	<i>angiotensin converting enzyme</i>
Ang II	Angiotensin II
AP	alkalische Phosphatase
AT ₁	Angiotensin II-Rezeptor Typ 1
BigET	Big-Endothelin
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
cDNA	<i>copy</i> Desoxyribonukleinsäure
CSE	Cholesterinsyntheseenzym
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECE	<i>endothelin converting enzyme</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ET	Endothelin
ET _A	Endothelin-Rezeptor A
ET _B	Endothelin-Rezeptor B
Fc	<i>crystallizable fragment</i>
GTC	Guanidinisothiocyanat
HEPES	Hydroxyethyl-Piperazin-Ethansulfonsäure
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cell</i>
iNOS	induzierbare NO-Synthase
ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierung
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
PKC	Proteinkinase C
ppET	Präproendothelin
RAS	Renin-Angiotensin-System
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	reverse Transkription
SDS	<i>sodium dodecyl sulfat</i>
SEM	Standardfehler
Tab.	Tabelle
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Unit</i>
VAD	Ventrikuläres Assist-System
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vs.	<i>versus</i>

1. Einleitung

Das Endothel bildet die einzellige innere Schicht der Blutgefäße. Mit einer Fläche von insgesamt etwa 100 Quadratmetern gehört es zu den größten Organen des menschlichen Organismus. Dabei bildet das Endothel nicht nur eine Barriere zwischen dem zirkulierenden Blut und den Bestandteilen der Gefäßwand, sondern ist auch metabolisch aktiv. Es produziert und setzt eine Reihe von Substanzen frei, welche die Kontraktion der Gefäßmuskelzellen, die Durchlässigkeit des Gewebes, die Fließeigenschaften des Blutes, die Gerinnung und die intrazellulären Wechselwirkungen im vaskulären Gefäßsystem beeinflussen. Eine verminderte Endothelfunktion erhöht das Risiko für Arteriosklerose und andere Herz-Kreislaufkrankungen, die häufigste Todesursache in den Industrieländern (WHO, 1993; Yusuf, 1998). Bekannte Risikofaktoren für die Entstehung von Herz-Kreislaufkrankungen sind Bluthochdruck, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, Nikotinabusus, Stress, Adipositas, mangelnde Bewegung, fortgeschrittenes Alter, männliches Geschlecht, sowie mögliche genetische Prädispositionen (Kannel, 1997). Bei Patienten mit Risikofaktoren für Arteriosklerose und endothelialer Dysfunktion (gestörte endothelvermittelte Gefäßfunktion), treten häufiger Herzinfarkte, Schlaganfälle und andere schwere kardiovaskuläre Ereignisse auf als bei Patienten mit vergleichbarem Risikoprofil und intaktem Endothel (Schachinger *et al.*, 2000).

Die koronare Herzkrankheit und der Schlaganfall sind die klinischen Endpunkte der Arteriosklerose. Die Arteriosklerose ist eine chronisch entzündliche Erkrankung und entwickelt sich über Jahre bzw. Jahrzehnte. Dabei führt eine gestörte Endothelfunktion zu zunehmender Cholesterineinlagerung, der Einwanderung von Leukozyten/Makrophagen in die Gefäßwand, der Proliferation glatter Muskelzellen und einer fortschreitenden Gefäßverengung bis zum Gefäßverschluss. Bei der Entstehung der Arteriosklerose kommt dem Endothel eine entscheidende Rolle zu, da es Substanzen produziert, die den Gefäßtonus beeinflussen sowie die Proliferation von glatten Muskelzellen stimulieren können. Zu jenen Substanzen gehören Prostacyclin, Angiotensin II (Ang II), Endothelin (ET), der aus dem Endothel stammende Hyperpolarisationsfaktor (EDHF, endothelium-derived hyperpolarizing factor) und Stickstoffmonoxid (NO). Die Freisetzung aus dem Endothel erfolgt durch Einwirkung biomechanischer Kräfte bzw. rezeptorvermittelt durch Substanzen wie Acetylcholin, Serotonin, Histamin, Thrombin, Bradykinin oder Katecholamine. Eine wichtige Rolle spielt dabei die endotheliale NO-Synthase (eNOS). Dieses Enzym bildet in Anwesenheit von Kalzium und Calmodulin L-Citrullin und NO aus der Aminosäure L-Arginin. Stickstoffmonoxid hat eine Reihe antiarteriosklerotischer Eigenschaften. Es

diffundiert aus den Endothelzellen in die darunter liegenden glatten Muskelzellen und stimuliert intrazellulär die lösliche Guanylatcyclase. Das dabei gebildete cyclische Guanosin-Monophosphat (cGMP) relaxiert die glatten Gefäßmuskelzellen und hemmt deren Proliferation (Garg *et al.*, 1989). NO inhibiert die Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle, verhindert die Aggregation von Blutplättchen (Radomski *et al.*, 1987; Khan *et al.*, 1996) und hemmt direkt die Oxidation von Lipoproteinen niedriger Dichte (LDL, low density lipoprotein). Ist die erzeugte oder verfügbare Menge an NO erniedrigt, so ist dies ein molekulares Zeichen einer endothelialen Dysfunktion (Britten *et al.*, 1999). Substanzen wie Azetylcholin, die normalerweise NO-vermittelt die Gefäße erweitern, können bei direktem Kontakt glatte Gefäßmuskelzellen kontrahieren und den Gefäßdurchmesser verringern. Die spezifische Antwort ist daher entscheidend von der funktionellen Integrität des Endothels abhängig.

Neben dem Vasodilatator Stickstoffmonoxid setzt das Endothel potente Vasokonstriktoren, wie Endothelin und Angiotensin frei. Das Endothel reguliert im gesamten vaskulären System den Gefäßtonus und die Permeabilität in Abhängigkeit vom Gefäßbett und den spezifischen Organanforderungen. Dies wird durch die spezifische Verfügbarkeit der genannten Mediatoren, biomechanische Kräfte oder Substanzen wie Serotonin, Histamin, Thrombin, Bradykinin sowie Katecholamine vermittelt. Darüber hinaus wird eine Gefäßbett-spezifische phänotypische Differenzierung der Endothelzellen als modulierend angesehen.

Die Regulation des Endothelins durch kardiovaskuläre Risikofaktoren und die Differenzierung des Endothels sind bisher jedoch nur unvollständig verstanden.

1.1 Endothelin

Die Endotheline sind eine Peptid-Familie, die vorrangig von Endothelzellen synthetisiert wird. Endothelin-1 wurde 1988 aus dem Überstand kultivierter Endothelzellen der Schweineaorta isoliert (Yanagisawa *et al.*, 1988). Bisher wurden drei Isoformen identifiziert, Endothelin-1 (ET-1), Endothelin-2 (ET-2) und Endothelin-3 (ET-3). Diese bestehen aus jeweils 21 Aminosäuren (Abb. 1.1) und werden von unterschiedlichen Genen kodiert (Inoue *et al.*, 1989a).

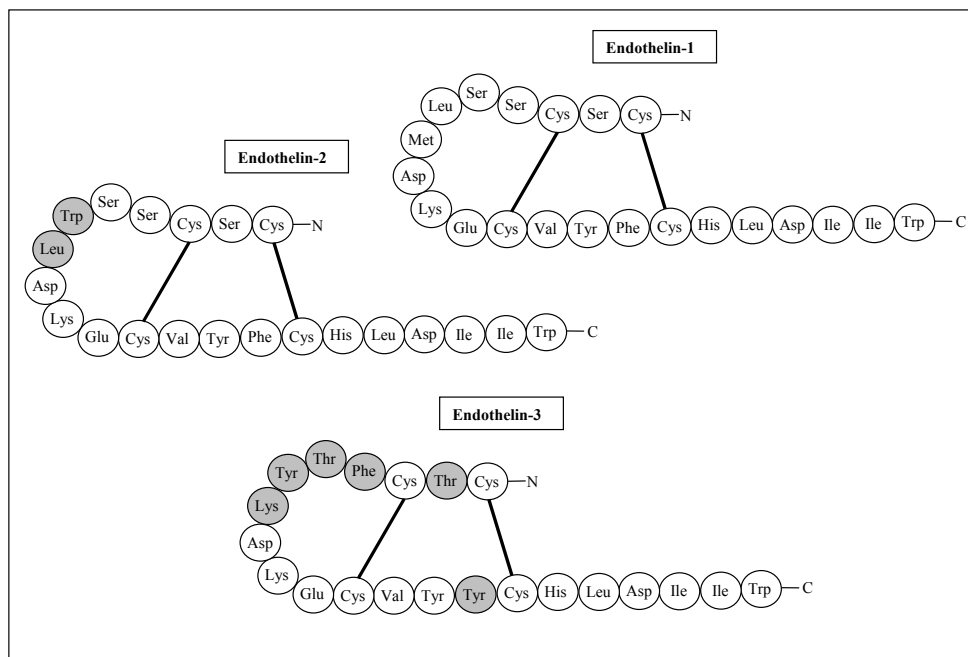


Abb. 1.1: Primärstruktur der Endotheline. Die Endotheline bilden zwei intrachenare Disulfidbrücken aus, die die Stabilität gegenüber Proteasen erhöhen. Essentiell für die Bildung ist das IIW-Motiv vor der Spaltungsstelle ($W^{21}-V^{22}$ bzw. $W^{21}-I^{22}$ in BigET-3), sowie die Aminosäuren am C-terminalen Ende der Big-Endotheline. Grau unterlegt sind die von ET-1 abweichenden Aminosäuren.

Das ET-1 wurde zuerst identifiziert und ist bisher am intensivsten untersucht (Inoue *et al.*, 1989b). Es ist der stärkste bisher bekannte Vasokonstriktor und die häufigste Endothelin-Isoform in Endothelzellen. ET-1 hat zusätzlich positiv inotrope und mitogene Effekte. Darüber hinaus reguliert es die Salz- und Wasser-Homöostase und stimuliert das Renin-Angiotensin-System (RAS) bzw. das sympathische Nervensystem (La *et al.*, 1995; Haynes *et al.*, 1998).

ET-1 wird auch im Herz, der Niere, dem Hypophysenhinterlappen, dem Zentralnervensystem und in glatten Muskelzellen der Gefäßwände gebildet (Gray *et al.*, 1995). Dabei ist die

Expression des ET-1-Gens in glatten Muskelzellen der Aorta 100-fach geringer, als in Endothelzellen.

ET-2 wird auf niedrigem Niveau in Endothelzellen, Herz und Niere gebildet (Howard *et al.*, 1992; Plumpton *et al.*, 1993). Die Bildung von ET-3 wurde bisher im endokrinen System, im Gastrointestinaltrakt und im Zentralnervensystem nachgewiesen (Gray *et al.*, 1995).

Die Biosynthese der Endotheline beinhaltet mehrere proteolytische Schritte. Dabei wird aus dem Primärtranskript Präproendothelin (ppET, alle Isoformen > 200 Aminosäuren) durch die Abspaltung einer kurzen Sekretionssequenz das Proendothelin gebildet. Die proteolytische Spaltung durch Furin bildet inaktive Vorstufen, die Big-Endotheline: BigET-1 (38 Aminosäuren), BigET-2 (37 Aminosäuren) und BigET-3 (41 Aminosäuren). Die aktiven Endotheline (je 21 Aminosäuren mit zwei intrachenaren Disulfidbrücken) entstehen durch proteolytische Spaltung der Trp²¹-Val²²-Peptidbindung (bzw. Trp²¹-Ile²² bei BigET-3) mit Hilfe des Endothelin-Konvertierungs-Enzyms (ECE) aus den Big-Endothelinen (Rubanyi *et al.*, 1991). Die bisher bekannten ECE-Isoformen haben eine höhere Affinität zur Spaltung von BigET-1 als von BigET-2 und BigET-3.

Ihre Wirkung üben die Endotheline über mindestens zwei Rezeptoren aus. Der Endothelin-Rezeptor A (ET_A) ist spezifisch für ET-1 ($K_i = 0,6$ nmol/L für ET-1, $K_i = 140$ nmol/L für ET-3). Der Endothelin-Rezeptor B (ET_B) hat eine vergleichbare Affinität für ET-1 und ET-3 ($K_i = 0,12$ nmol/L bzw. $K_i = 0,06$ nmol/L). Die Affinität für ET-2 liegt für beide Rezeptoren zwischen denen für ET-1 und ET-3. Die ET-Rezeptoren, die an die G-Proteine G_q bzw. G_i gekoppelt sind, gehören zur Familie der siebenfach-gefalteten Transmembran-Rezeptorproteine. Das G_q-Protein aktiviert die Phospholipase C, die aus Phosphatidylinositol Inositol-3-phosphat und Diacylglycerol freisetzt. Diese „second messenger“ aktivieren die intrazellulären Kalziumspeicher und die Proteinkinase C. Über diese Signalwege kommt es in den Muskelzellen, hauptsächlich ET_A-Rezeptor-vermittelt, zur Kontraktion bzw. zur positiven Inotropie. Das G_i-Protein hemmt die Bildung von cyclischem Adenosin-Monophosphat (cAMP) durch die Adenylatcyclase, dadurch kann z.B. eine α -adrenerge Stimulation, die über das G_s-Protein stimulierend auf die Adenylatcyclase wirkt, moduliert werden.

Ein weiterer über die ET-Rezeptoren regulierter Signalweg führt über die durch extrazelluläre Signale regulierten Kinasen (ERKs), die zur Familie der mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPK) gehören. Diese aktivieren Transkriptionsfaktoren (c-fos, c-jun, egr-1) sowie Translationsfaktoren (PHAS-I) und führen damit z.B. zu erhöhter Proteinsynthese bzw. zur Zellteilung (Sugden *et al.*, 1996). Darüber hinaus gibt es in Endothelzellen Signalwege, die eine ET-vermittelte Freisetzung vasodilatatorischer Substanzen (Stickstoffmonoxid, Prostaglandin) bewirken. Eine intravenöse Injektion von ET-1 führt initial zu einer

Vasodilatation, die anschließend in eine lang anhaltende Vasokonstriktion übergeht (Yanagisawa *et al.*, 1988; Minkes *et al.*, 1989). Erfolgt die ET-1-Gabe langsam (Infusion über 1 Stunde), wird keine transiente Dilatation beobachtet (Mortensen *et al.*, 1990). Dies verdeutlicht die Wirkung von ET-1 über die beiden ET-Rezeptoren (ET_A und ET_B) und ihre unterschiedlichen Wirkungen in verschiedenen Zelltypen. Die glatten Muskelzellen der Gefäße besitzen ET_A- und ET_B-Rezeptoren, wobei die Vasokonstriktion hauptsächlich über den ET_A-Rezeptor vermittelt wird. Die Endothelzellen besitzen im Allgemeinen nur den ET_B-Rezeptor, wobei die Dichte und Verteilung sowie das Vorkommen von ET_A-Rezeptoren in Endothelzellen von den Gefäßen und der untersuchten Spezies abhängig ist (N'Diaye *et al.*, 1997; Heinroth-Hoffmann *et al.*, 1998). In den Endothelzellen vermittelt der ET_B-Rezeptor die Bildung und Freisetzung der Vasodilatoren. Bei der intravenösen Injektion von ET-1 überwiegt kurzfristig der ET_B-vermittelte vasodilatatorische Effekt, bevor das zirkulierende ET-1 die glatten Muskelzellen erreicht und die Vasokonstriktion induziert.

Die lang anhaltende vasokonstriktorische Wirkung von ET-1 ist auf eine sehr feste Bindung zwischen Rezeptor und Agonist zurückzuführen. Der Umsatz von ET-1 im Plasma ist dagegen sehr schnell (Halbwertszeit: 1 min im Plasma). Endothelin wird über zwei Wege aus dem Plasma entfernt: a) Internalisierung durch den ET_B-Rezeptor (daher auch als Clearance-Rezeptor bezeichnet) vor allem in Lunge und Niere (Sirvio *et al.*, 1990; Wagner *et al.*, 1992b; Loffler *et al.*, 1993; Fukuroda *et al.*, 1994) und anschließender Abbau in lytischen Kompartimenten (Nakamura *et al.*, 1990; Jackman *et al.*, 1993), sowie b) hydrolytische Metabolisierung durch neutrale Endopeptidase (Abassi *et al.*, 1993).

Die Expression der Endothelgene kann durch eine Vielzahl von Stimuli reguliert werden. Vasoaktive Hormone, Wachstumsfaktoren, freie Radikale, Endotoxine, Cyclosporin und Hypoxie erhöhen die Präproendothelin-Expression; Stickstoffmonoxid, natriuretisches Peptid (ANP), Heparin sowie Prostaglandine verringern sie dagegen (Gray *et al.*, 1995).

In zahlreichen Untersuchungen konnte eine erhöhte Plasmakonzentrationen von ET-1 bei Herz-Kreislaufkrankungen beobachtet werden (Kohno *et al.*, 1990; Saito *et al.*, 1990; Battistini *et al.*, 1993). ET-1 ist jedoch vorrangig ein auto- und parakriner Faktor. Die ET-1-Konzentrationen im Plasma sagen daher nur wenig über die lokale Endothelinwirkung und -verfügbarkeit aus (de Nucci *et al.*, 1988). Zusätzlich werden 80% des von Endothelzellen synthetisierten ET-1 abluminal sezerniert (Wagner *et al.*, 1992a). Trotz der daher gebotenen Zurückhaltung gibt es eine Reihe von Befunden, die für eine enge Korrelation von erhöhten Plasmaendothelinspiegeln und Schweregrad bzw. Prognose von kardiovaskulären Erkrankungen (z.B.: Myokardinfarkt, Arteriosklerose, chronische Herzinsuffizienz,

kardiogener Schock, Subarachnoidalblutungen, Hypertonie) sprechen (Battistini *et al.*, 1993; Monge, 1998).

Die Expression der Gene des Endothelin-Systems im Myokard ist in Abhängigkeit von Pathogenese und Schweregrad bisher widersprüchlich. Im humanen Myokard hat vorrangig der ET_A-Rezeptor funktionelle Bedeutung für das Kontraktionsverhalten der Myozyten. In einer ersten Untersuchung bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz ist der ET_A-Rezeptor weder funktionell noch in seiner Dichte verändert (Ponicke *et al.*, 1998). In einer zweiten Untersuchung des linken Ventrikels von Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz wurde eine unveränderte mRNA-Expression von Präproendothelin-1, der ET_A-Rezeptor und ECE-1, jedoch eine verringerte Expression des ET_B-Rezeptors gezeigt. Zusätzliche Rezeptorbindungsstudien sprechen in diesen Patienten für eine erhöhte ET_A- und eine verringerte ET_B-Rezeptordichte (Zolk *et al.*, 1999). Bei weiteren Untersuchungen im humanen ventrikulären Myokard wurde bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) eine erhöhte ET_A- bei unveränderter ET_B-Rezeptordichte nachgewiesen (Pieske *et al.*, 1999). Die Regulation der Expression des ECE-1 ist dagegen noch wenig untersucht.

1.2 Endothelin-Konvertierungs-Enzyme

Der letzte Schritt der Endothelin-Synthese wird durch das Endothelin-Konvertierungs-Enzym (ECE) katalysiert. Seit der Klonierung 1994 wurden drei Isozyme beschrieben (ECE-1, ECE-2, ECE-3). Allein von ECE-1 wurden bisher vier Isoformen in unterschiedlichen Spezies identifiziert (Ikura *et al.*, 1994; Schmidt *et al.*, 1994; Shimada *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 1994; Emoto *et al.*, 1995; Shimada *et al.*, 1995a; Shimada *et al.*, 1995b; Schweizer *et al.*, 1997; Hasegawa *et al.*, 1998; Valdenaire *et al.*, 1999). Diese ECE-1-Isoformen wurden aufgrund ihrer fast zeitgleichen Entdeckung in unterschiedlichen Spezies alternativ benannt. In dieser Arbeit werden die Isoformen entsprechend der Nomenklatur von Schweizer und Valdenaire als ECE-1a, ECE-1b, ECE-1c und ECE-1d bezeichnet (genetische Struktur siehe Anhang 1). Die ECEs gehören zur M13-Familie der Peptidasen mit dem charakteristischen Vertreter Neprilysin (= neutrale Endopeptidase, NEP, EC 3.4.24.11).

ECE-1 (EC 3.4.24.71) gehört zu dem Typ II membrangebundener Metalloendopeptidasen. Diese enthalten ein konserviertes HEXXH-Motiv in der katalytischen Domäne, das über zwei Histidine zwei der drei Koordinierungsstellen für den Co-Faktor Zink bereitstellt und mit Glutaminsäure das katalytische Zentrum bildet. Die ECEs weisen 10 potentielle N-Glykosylierungsstellen auf. Ihre Aktivität ist von der korrekten Kohlenhydratmodifizierung abhängig. (Schweizer *et al.*, 1997; Nelboeck *et al.*, 1998). Das aktive ECE-1 bildet ein kovalentes Dimer von ca. 250 kDa. Die Abbildung 1.2 zeigt die vorgeschlagene Topologie.

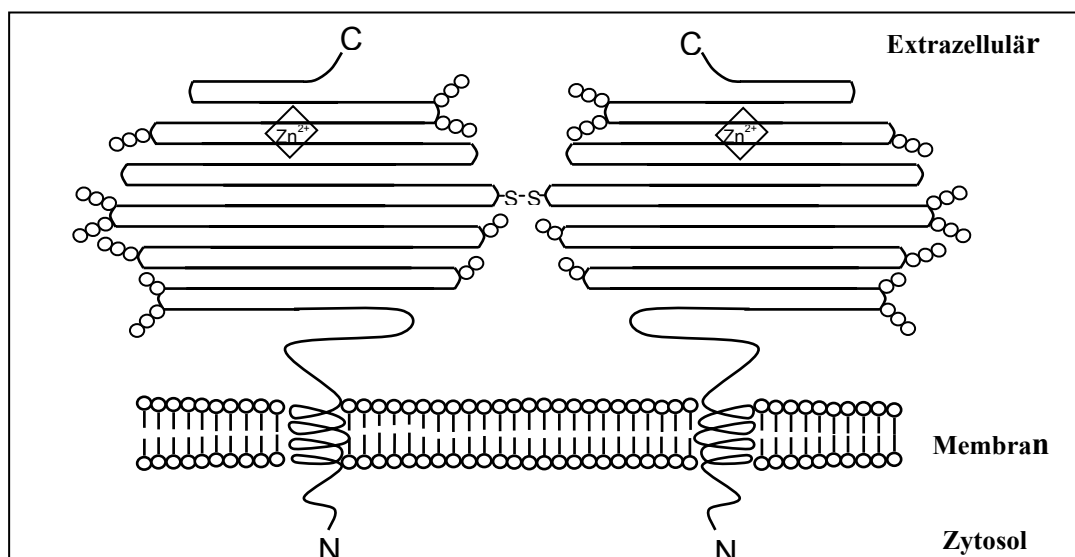


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der ECE-Topologie als integrales, dimeres Typ II- Membranprotein. Das Transmembransegment enthält 21 Aminosäuren. Die beiden Monomere sind durch eine Disulfidbrücke (in ECE-1b Cys⁴¹²) kovalent verknüpft. Offene Kreise symbolisieren die 10 N-Glykosylierungsketten der Monomere. Das Zink-Ion (Zn^{2+}) im katalytischen Zentrum wird von dem konservierten Zinkbindungs-motiv (HEXXH) umgeben. Für die ECE-1-Isoformen ist die gesamte katalytische Domäne identisch, während die N-terminalen Sequenzen der zytosolischen Domäne variieren.

Die ECEs zeigen eine hohe Substratspezifität. Sie führen die spezifische Spaltung von BigET zu ET durch. Dabei haben ECE-1 und ECE-2 eine höhere Spezifität für BigET-1, als für BigET-2 oder BigET-3 (1 : 0,1 : 0,1). Der C-Terminus der Big-Endotheline ist von entscheidender Bedeutung für die Substraterkennung (Okada *et al.*, 1991; Okada *et al.*, 1993). Das kürzlich isolierte ECE-3 spaltet dagegen vorrangig BigET-3, während BigET-1 nicht umgesetzt wird (Hasegawa *et al.*, 1998).

In vitro wurde bei sehr hohen Bradykininkonzentrationen auch der Umsatz von Bradykinin durch ECE-1 gezeigt ($K_m = 1$ mM im Gegensatz zu $K_m = 0,5$ μ M für BigET-1) (Hoang *et al.*, 1997). Diese Funktion spielt *in vivo* im Vergleich zu den bisher bekannten Bradykinin-inaktivierenden Enzyme NEP und ACE jedoch wahrscheinlich eine eher untergeordnete Rolle (ACE: $K_m = 0,4$ μ M; NEP: $K_m = 90$ μ M).

Die drei bisher beschriebenen ECEs unterscheiden sich in ihrem pH-Optimum (ECE-1-Isoformen: pH 6,8 - 7,0; ECE-2: pH 5,5 sogar inaktiv bei pH 7,0; ECE-3: pH 6,6). Durch SDS-Gelelektrophorese wurde die molekulare Masse der glykosylierten Monomere bestimmt (ECE-1: 125-130 kDa, ECE-2: 130 kDa, ECE-3: 140 kDa). Alle ECEs werden durch Phosphoramidon gehemmt ($IC_{50} \approx 1$ μ M), jedoch durch Thiorphan nicht inhibiert. Dies unterscheidet sie von der neutralen Endopeptidase, die durch beide Inhibitoren gehemmt wird. Die vier humanen ECE-1-Isoformen werden durch alternatives Splicing eines Gens gebildet, das in der Chromosomenregion 1p36.1 lokalisiert ist. Die Expression der ECE-1-Isoformen wird durch unterschiedliche Promotoren reguliert (Orzechowski *et al.*, 1997; Schweizer *et al.*, 1997). Die Isoformen unterscheiden sich in ihrer zytoplasmatischen, N-terminalen Proteinsequenz. Die Transmembrandomäne sowie die katalytische Domäne sind dagegen identisch. Dadurch sind ihre katalytischen Eigenschaften identisch. Für die intrazelluläre Lokalisation der Isoformen sind die zytoplasmatischen Anteile verantwortlich. Die subzelluläre Lokalisation der ECEs wurde lange kontrovers diskutiert. Neuere Untersuchungen ergeben ein genaueres Bild. (Schweizer *et al.*, 1997; Azarani *et al.*, 1998; Barnes *et al.*, 1998; Emoto *et al.*, 1999). Es gibt jeweils mindestens eine extrazelluläre ECE-1-Isoform, die für die Umwandlung von extrazellulärem BigET-1 verantwortlich ist. Diese wird hauptsächlich in Zellen gebildet, die durch extrazelluläre Signale reguliert werden. Zellen, die aktiv ET-1 sezernieren, bilden mindestens eine intrazelluläre ECE-1-Isoform, die einem schnellen Abbau in lytischen Kompartimenten unterliegt. Da gerade die N-terminalen Sequenzen in den unterschiedlichen Spezies variieren, sind Lokalisationen nicht immer von einer Spezies auf die andere übertragbar. In humanen Zellen ist ECE-1a in der Plasmamembran lokalisiert, ECE-1b vermittelt die intrazelluläre Prozessierung von BigET-1.

ECE-1c nimmt eine Zwischenstellung ein, da es zwischen der Plasmamembran und dem Golgi-Netzwerk transloziert wird.

Daher kommt der exakten Kenntnis der Isoformmuster in unterschiedlichen Geweben für das Verständnis der Regulation der ET-1-Produktion und die Entwicklung pharmakologischer Substanzen zur ECE-Inhibition große Bedeutung zu. Die Regulation der unterschiedlichen ECE-1-Isoformen durch proarteriosklerotische Stimuli ist jedoch noch wenig untersucht. Darüber hinaus gibt es bisher nur wenige Untersuchungen zur Regulation der ECE-1-Expression bei kardiovaskulären Erkrankungen. Zu Beginn der Arbeiten war lediglich bekannt, dass die mRNA-Expression des ECE-1-Gens in Patienten mit Myokardinfarkt erhöht ist (Bohnemeier *et al.*, 1998). Tierexperimentelle Untersuchungen an einem Hypertrophiemodell (kultivierte Rattenkardiomyozyten nach α -adrenerger Stimulation) zeigen, dass eine erhöhte ET-1-Produktion zu Hypertrophie führt und der erhöhte ET-1-Spiegel durch eine erhöhte Expression der ECE-1-mRNA verursacht wird (Kaburagi *et al.*, 1999).

Ziel des ersten Teils der vorliegenden Arbeit war daher ein besseres Verständnis der Regulation unterschiedlicher ECE-1-Isoformen in humanen Endothelzellen, die Regulation des Endothelin-Systems in tierexperimentellen Modellen kardiovaskulärer Risikofaktoren sowie klinische Untersuchungen im Gewebe von Patienten mit koronarer Herzkrankheit bzw. Herzinsuffizienz.

1.3 Das vaskuläre System – Entwicklung, Aufbau und Funktion

Das vaskuläre System ist eines der ersten Organsysteme, das sich während der Embryogenese ausbildet. Dabei bilden sich aus einem ungeordneten vaskulären Plexus in kurzer Zeit ein hochgeordnetes System aus Arterien, Venen und mikrovaskulären Gefäßen sowie die frühe Anlage des Herzens. In diesem Organisationsprozess scheinen die Endothelzellen eine entscheidende funktionelle Rolle zu spielen. Schon im vaskulären Plexus sind distinkte Populationen von venösen und arteriellen Zellen nachweisbar. Genetische Veränderungen dieser Organisation durch Mutationen führen zu massiven, letalen Missbildungen des Embryos, vor allem bei der Ausbildung des Herzens und der Aorta.

Den Endothelzellen wurde früher eine reine Barrierefunktion zur Abgrenzung der Zirkulation von den Geweben zugesprochen. In den letzten 25 Jahren ist immer deutlicher geworden, dass es sich bei Endothelzellen nicht nur um eine innere Auskleidung der Gefäße handelt, sondern um ein komplexes Organsystem mit vielfältigen Funktionen in der Differenzierung des vaskulären Systems, der Regulation des Blutdrucks und der Synthese und Freisetzung auto- und parakriner Faktoren.

In der Entwicklung von Gefäßen werden zwei grundsätzliche Prozesse voneinander unterschieden: Vaskulogenese und Angiogenese. Die Vaskulogenese ist die Neubildung von Gefäßen im Rahmen der Embryonalentwicklung. Die Angiogenese, beschreibt die Neubildung von Gefäßen durch Sprossung oder Teilung aus vorhandenen Gefäßen im Rahmen der Embryogenese, Wundheilung, Reperfusion und Tumorprogression. Während der Vaskulogenese entsteht aus dem primären vaskulären Plexus, einem einfachen, scheinbar ungeordneten Netz von Endothelzellen, das vaskuläre System. Dabei kommt es durch die Wirkung angiogener Faktoren (z.B. vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor, VEGF) im Zusammenspiel mit dem Angiopoietin/Tie-System und dem Ephrin/Eph-System durch Progression und Regression von tubulären Strukturen zur Strukturbildung und Reifung von Gefäßen. Die Reifung von Gefäßen erfordert neben der Ausbildung von tubulären Strukturen die Integration der Endothelzellen mit den sie umgebenden Zellen. Von besonderer Bedeutung sind dabei glatte Muskelzellen und Perizyten, die sich gemeinsam aus den mesenchymalen Zellen entwickeln. Die Notwendigkeit dieser Zell-Zell-Interaktionen für den Aufbau intakter Gefäßen zeigen Versuche zur Überexpression von VEGF, wobei die Neubildung von Gefäßen induziert wird (Detmar *et al.*, 1998; Larcher *et al.*, 1998). Diese Gefäße bleiben jedoch ohne die Einwirkung von weiteren Faktoren in einem unreifen, durchlässigen Entwicklungsstand, da offensichtlich die Rekrutierung und Vernetzung der umgebenden Zellen gestört ist (Thurston *et al.*, 1999).

Das derzeitige Modell der vaskulären Entwicklung geht daher von einer Hierarchie von Faktoren aus, bei denen VEGF die essentielle Funktion der Wachstumsförderung übernimmt. Angiopoietin-1 fördert über den Tie2-Rezeptor die Gefäßstabilität, während Angiopoietin-2 durch Blockade des Tie2-Rezeptors eine Sprossung durch Destabilisierung von intakten Gefäßen ermöglicht. Ephrin-B2 und EphB4 werden als entscheidende Faktoren für die arteriovenöse Differenzierung angesehen, wobei die Expression von EphB4 die Bildung von venösen Gefäßen markiert, während die Expression von Ephrin-B2 ein notwendiger Bestandteil bei der Bildung von arteriellen Gefäßen ist (Yancopoulos *et al.*, 2000).

Im adulten vaskulären System bestehen die Arterien aus einer Lage arterieller Endothelzellen, der extrazellulären Basallamina sowie einer je nach Lage im Gefäßsystem unterschiedlich dicken Schicht glatter Muskelzellen. Die großen Arterien verzweigen sich zu immer kleineren Arterien bis zu den Arteriolen in den Organen. An sie schließt sich ein verzweigtes Kapillarnetz (Mikrozirkulation) an, das den Gas- und Stoffaustausch des Blutes mit dem umliegenden Gewebe vermittelt. Diese Kapillaren sind aus einem einschichtigen Endothel mit umgebenden Perizyten aufgebaut. An die mikrovaskulären Gefäße schließen sich Venolen an, die sich in immer größeren Venen sammeln, um das Blut schließlich zum Herzen zurückzuführen. Die Venen sind mit einer Lage venöser Endothelzellen ausgekleidet, die von wenigen Lagen glatter Muskelzellen umgeben sind.

Neben der Transportfunktion des vaskulären Systems, der Versorgung der Organe mit Sauerstoff und Nährstoffen, der Weiterleitung humoraler Signale und dem Abtransport von Stoffwechselendprodukten, kommen dem Gefäßsystem und insbesondere dem Endothel metabolischen Funktionen zu.

1.4 Das Ephrin/Eph-System

Eines der wichtigsten Ereignisse während der Entwicklung des vaskulären Systems ist die Entwicklung von Arterien und Venen. Über die molekularen Mechanismen der arteriovenösen Differenzierung ist jedoch bisher nur sehr wenig bekannt. Neuere Untersuchungen zeigen, dass arterielle und venöse Endothelzellen sich schon in den frühesten Entwicklungsstadien molekular unterscheiden. Das erste Beispiel eines arteriovenösen Differenzierungsmarkers ist das Expressionsmuster des Tyrosinkinase-Rezeptors EphB4, der überwiegend auf venösen Endothelzellen exprimiert wird, während sein Ligand Ephrin-B2, vorrangig auf arteriellen Endothelzellen exprimiert wird (Wang H. U. *et al.*, 1998; Gerety *et al.*, 1999).

Das Ephrin/Eph-System stellt die größte bekannte Familie von Rezeptortyrosinkinasen dar (Zhou, 1998). Dabei handelt es sich um zwei Untergruppen, die sich sowohl funktionell als auch strukturell unterscheiden. Bisher wurden 8 Mitglieder der EphA-Rezeptoren (A1-A8) identifiziert, die mit 5 Ephrin-A-Liganden interagieren. Von der zweiten Gruppe, den EphB-Rezeptoren, wurden bisher 6 Mitglieder identifiziert (B1-B6). Diese interagieren mit den Ephrinen-B1, -B2 und -B3. Die Eph's sind Rezeptortyrosinkinasen mit Spezifität für die Liganden der jeweiligen Gruppe (EphA binden Ephrine-A; EphB binden Ephrine-B). Die Gruppen sind durch spezifische Bindungskonstanten und Aktivierungsparameter gekennzeichnet. Durch temporär und spatial überlappende Expression der Bindungspartner können fein regulierte Gradienten entstehen, die vor allem in der Strukturausprägung und Differenzierung von Nerven und der Gehirnentwicklung intensiv untersucht wurden (Wilkinson, 2001). Die Liganden sind in der Membran verankert und können ein Signal in die ligandentragende Zelle transduzieren. Die Ephrin-A-Liganden sind über einen GPI-Anker an der Membran gebunden und benötigen für die Signalweitergabe Adaptormoleküle, die bisher noch nicht bekannt sind. Die Ephrin-B-Liganden sind durch eine membrandurchspannende Helix in der Membran verankert. Ihre zytoplasmatische Domäne enthält Tyrosinreste, die bei Aktivierung phosphoryliert werden (Palmer *et al.*, 2002). Allerdings fehlt auch den Ephrin-B-Liganden eine intrinsische Kinase-Domäne. Die Aktivierung aller Eph-Rezeptoren erfolgt nicht durch monomere lösliche Liganden. Sie erfordert vielmehr eine Zusammenlagerung (clustering) von mehreren Liganden. Die Anzahl der benötigten Liganden ist dabei von den Rezeptoren und den Liganden selbst abhängig. Experimentell wurden für die Aktivierung der Rezeptoren Ligand-Fc-Chimären hergestellt. Dabei handelt es sich um die jeweilige extrazelluläre Domäne des entsprechenden Ephrins, die mit dem Fc-Fragment eines Immunglobulins gekoppelt werden (Fc-Chimäre). Durch Bindung eines Antikörpers an den Fc-Teil der Ligand-Fc-Chimäre kann eine Multimerisierung und damit eine Aktivierung der

möglichen Rezeptoren induziert werden (Davis S. *et al.*, 1994). *In vivo* wird die Multimerisierung durch die Membranverankerung der Liganden ermöglicht. Das Ephrin/Eph-System kann daher ausschließlich Signale von einer Zelle zur anderen weitergeben, wenn diese in direktem Kontakt miteinander stehen. Schwerpunkt der Untersuchungen in dieser Arbeit bilden die für die arteriovenöse Differenzierung wichtigen EphB4 und Ephrin-B2.

Die Phänotypen der Ephrin-B2 und EphB4 „knock out“-Tiere sind vergleichbar (Wang H. U. *et al.*, 1998; Adams *et al.*, 1999; Gerety *et al.*, 1999). Die Mäuseembryos sterben zwischen Tag 9.5 – 10 mit schweren Defekten in der Vaskularisierung und sowie mangelhafter Ausbildung von Trabekeln und Endokardkissen am Herzen. Während Ephrin-B2 neben endothelialen Zellen auch in anderen Zelltypen exprimiert wird, ist die Expression von EphB4 auf endotheliale Zellen beschränkt (Gerety *et al.*, 1999). EphB4 bildet unter den Eph-Rezeptortyrosinkinasen eine Ausnahme, da es ausschließlich Ephrin-B2 mit hoher Affinität bindet (Brambilla *et al.*, 1996). Sowohl EphB2, als auch EphB3 stellen Rezeptoren für Ephrin-B2 dar. Beide sind in Endothelzellen exprimiert. Im Gegensatz zu den EphB4-„knock out“-Tieren weisen EphB2- und EphB3-„knock out“-Mäuse keinen pathologischen Phänotyp auf. Ein Ausfall beider Rezeptoren bewirkt einen semiletalen Phänotyp (der 30% der Tiere betrifft). Diese Befunde unterstützen eine besondere *in vivo* Relevanz des Ligand-Rezeptorpaars Ephrin-B2/EphB4 bei der vaskulären Entwicklung. Während Ephrin-B2 im vaskulären System der Maus exklusiv auf arteriellen Endothelzellen exprimiert wird (Wang H. U. *et al.*, 1998; Adams *et al.*, 1999), kann EphB4 vorrangig auf venösen Endothelzellen nachgewiesen werden.

Über die Expression des Ephrin-B2/EphB4-Systems in humanen Geweben, sowie die funktionelle Relevanz liegen bisher wenige Erkenntnisse vor. Darüber hinaus ist die Regulation des Ephrin/Eph-Systems durch biomechanische Kräfte in Endothelzellen nicht untersucht worden.

1.5 Das Angiopoietin/Tie-System

Parallel zu den VEGF-Rezeptoren wurden die Tie-Rezeptortyrosinkinasen Tie1 und Tie2 (auch Tek genannt) entdeckt (Sato *et al.*, 1993; Ziegler *et al.*, 1993). Obwohl sich die VEGF-Rezeptoren sich molekular von den Tie-Rezeptoren eindeutig unterscheiden, zeigen die Phänotypen der „knock out“-Modelle, dass VEGF-Rezeptoren und Tie-Rezeptoren für die normale Entwicklung der Blutgefäße essentiell sind (Dumont *et al.*, 1994; Sato *et al.*, 1995). Die Tie-Rezeptoren haben eine extrazelluläre Region mit zwei Immunglobulin (Ig)-ähnlichen Domänen, die durch drei Epidermale Wachstumsfaktor (EGF)-ähnliche Cystein-Wiederholungen getrennt sind. Daran schließen sich drei Fibronectin Typ III-homologe Domänen an. Intrazellulär haben die Tie-Rezeptoren eine ähnliche Domänenstruktur, wie die VEGF-Rezeptoren. Beide Rezeptor-Familien bestehen intrazellulär aus zwei Tyrosinkinasedomänen, die jeweils durch einen kurzen Bereich von Aminosäuren („Kinase insert“) getrennt sind.

Die spezifischen Liganden des Tie2-Rezeptors sind eine neue Gruppe von Wachstumsfaktoren mit hoher Spezifität für das vaskuläre Endothel, die Angiopoietine. Die bisher bekannten vier Angiopoietine (Angiopoietin-1, Angiopoietin-2, Angiopoietin-3 und Angiopoietin-4) binden ausschließlich extrazellulär an den Tie2-Rezeptor. Der natürliche Agonist für den Tie1-Rezeptor konnte bisher nicht identifiziert werden. Ungewöhnlich ist dabei, dass die Angiopoietine entgegengesetzte Reaktionen in Endothelzellen hervorrufen. Angiopoietin-1 und Angiopoietin-4 wirken als aktivierende Liganden (Agonisten), während Angiopoietin-2 und Angiopoietin-3 spezifisch als blockierende Liganden (Antagonisten) wirken (Maisonpierre *et al.*, 1997).

Die Tie-Rezeptoren scheinen für das angiogene Remodeling und die Stabilisierung der Gefäße nach der initialen Vaskulogenese notwendig zu sein. Mausembryonen mit Defekten im Tie2-Signalweg sterben in der Embryonalentwicklung zwischen Tag 9.5 und 12.5 als Folge einer unzureichenden Erweiterung und Erhaltung des primären kapillären Plexus (Sato *et al.*, 1995). Dabei kommt es zu schweren Defekten durch eine unvollständige Entwicklung der Herzregion, mit Ablösung des Endokards von der myokardialen Wand und Abwesenheit von myokardialen Projektionen (Trabekeln). Zusätzlich wird eine hämorrhagische Vaskulatur mit geringer Anzahl an Begleitzellen und eine geringere Anzahl von Endothelzellen beobachtet. Bei Ausfall des Tie1-Rezeptors sterben die Embryonen wenig später in der Entwicklung Tag 13.5, aufgrund unvollständig entwickelter Gefäße. Die kardiale Entwicklung verläuft in diesen Embryonen jedoch normal. In den Gefäßen von Embryonen mit Tie2- oder Angiopoietin-1-Gen-Defekt sind zusätzlich die Verbindungen zwischen den

Endothelzellen und den benachbarten Zellen gestört (Suri *et al.*, 1996). Im Gegensatz dazu zeigen Angiopoietin-1-überexprimierende Mäuse größere und stärker verzweigte Gefäße, die eine hohe Resistenz gegenüber inflammatorischen und permeabilitätssteigernden Stimuli aufweisen (Thurston *et al.*, 1999).

Vermutlich handelt es sich bei dem Tie-Signalweg um einen zellautonomen Signalweg, der für das Überleben der Endothelzellen notwendig ist. Die geringere Rekrutierung periendothelialer Zellen scheint ein sekundärer Effekt zu sein. Dafür spricht die Beobachtung, dass ein konditionaler „knock out“ des Tie2-Gens zu einer erhöhten Endothelzellapoptose führt und der Tie2-Rezeptor auch in adulten Endothelzellen exprimiert und phosphoryliert ist (Wong *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 2001).

Das Angiopoietin/Tie-System spielt offensichtlich eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung und Destabilisierung von Gefäßen. Während Angiopoietin-1 durch die Aktivierung von Tie2 stabilisierend auf die Gefäße wirkt, kommt es durch die Bindung von Angiopoietin-2 zu einer Destabilisierung, mit möglicher Gefäßsprossung. In Abwesenheit von weiteren angiogenen Faktoren kommt es durch Angiopoietin-2 dagegen zu einer Regression von Gefäßen. Diese Bedeutung von Angiopoietin-2 wird durch seine Expression in Bereichen aktiven Gefäßumbaus und in stark vaskularisierten Tumoren untersetzt (Stratmann *et al.*, 1998; Holash *et al.*, 1999; Zagzag *et al.*, 1999).

Die Angiopoietine sind lösliche Liganden mit einer rezeptorbindenden, fibrinogen-ähnlichen und einer „coiled-coil“-Domäne, die die Multimerisierung der Liganden ermöglicht (Procopio *et al.*, 1999). Für das humane Angiopoietin-1 sind bisher drei unterschiedliche gespleißte Isoformen nachgewiesen worden (Huang *et al.*, 2000). Das humane Angiopoietin-2 hat zwei Isoformen. Das in der Maus identifizierte Angiopoietin-3 ist das orthologe Protein zum humanen Angiopoietin-4. Viele Rezeptortyrosinkinasen werden durch die Bindung ihrer multimerisierten Liganden aktiviert. Die unterschiedlichen Potenz zur Multimerbildung, könnte die unterschiedliche Wirkung von Angiopoietin-1 und Angiopoietin-2 auf den Tie2-Rezeptor erklären (Procopio *et al.*, 1999).

Die Regulation der Expression des Angiopoietin/Tie-Systems durch biomechanische Kräfte ist in humanen Endothelzellen bisher nicht untersucht worden.

Ziel des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit war daher die Untersuchung der Expression des Ephrin/Eph- und des Angiopoietin/Tie-Systems durch Schubspannung in humanen Endothelzellen. Darüber hinaus wurden erste Experimente zur Aufklärung der zugrunde liegenden Signaltransduktionsmechanismen durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Die Grundchemikalien wurden in analysenreiner Qualität (p.a.) von den folgenden Herstellern bezogen:

- Merck, Darmstadt,
- Riedel-de Haen AG, Seelze,
- Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg,
- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen,
- Roth, Karlsruhe.

Zellkulturprodukte der Firma Clonetics wurden über CellSystems[®] Biotechnologie Vertrieb GmbH, St. Katharinen bezogen.

Zur Herstellung von Lösungen, Puffern, Medien und Reaktionsansätzen wurde deionisiertes Wasser (dH₂O) verwendet (Seralpur Delta UF, Seral, Ransbach-Baumbach).

Die Reagenzien für die RT und PCR wurden von Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

In RNA-Analysen wurde für Lösungen und Reaktionsansätze dH₂O eingesetzt, das durch Behandlung mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) RNase-frei ist. Dazu wurde 1 l dH₂O mit 100 µl DEPC versetzt, über Nacht inkubiert und das verbleibende DEPC durch Autoklavieren inaktiviert.

2.1.1 Zellkulturprodukte

Produkt	Hersteller
Antibiotic-Antimycotic (AB/AM;100×) 10000 U Penicillin 10000 µg Streptomycin 25 µl/ml Amphotericin B in phys. NaCl	Invitrogen, Karlsruhe
Newborn calf serum hitzeinaktiviert	Biochrom KG, Berlin
Dulbeccos phosphate-buffered saline I (PBS I) ohne Zusatz von Natriumbikarbonat	Invitrogen, Karlsruhe
Dulbeccos phosphate-buffered saline II (PBS II) ohne Zusatz von Natriumbikarbonat ohne Zusatz von Kalzium und Magnesium	Invitrogen, Karlsruhe
Endothel cell growth suppl. (ECGS)	cc pro, Neustadt
Microvascular Endothelial Cell Growth Medium 2 (EGM2 [®] -MV)	CellSystems, St. Katharinen
Fungizon 250 µg/ml Amphotericin B	Invitrogen, Karlsruhe
Gelatine	Serva, Heidelberg
Hanks Balanced Salt Solution (HBSS-Lösung) ohne Kalzium und Magnesium ohne Phenolrot	Invitrogen, Karlsruhe
Medium 199 (M199) Earle's Salze L-Glutamin 1,25 g/l Natriumbikarbonat Phenolrot	Invitrogen, Karlsruhe
LURIA BROTH BASE (LB-Medium)	Invitrogen, Karlsruhe
LURIA AGAR (LB-Agar)	Invitrogen, Karlsruhe
OPTIVA [®] 2 Venenverweilkanüle (18G)	Johnson-Johnson Medical, Brüssel
OBTURATOR Mandrin (18G)	Johnson-Johnson Medical, Brüssel

2.1.2 Zellkulturmedien

Collagenaselösung	0,05%ig Collagenase IV in PBS II
Endothelzellmedium 10 (10% Serum)	10% Newborn calf serum 15 mM HEPES 1:100 AB/AM 1:100 Fungizon in Medium 199 mit 1 M NaOH auf pH 7,4 einstellen
Endothelzellmedium 0,5 (0,5% Serum)	0,5% Newborn calf serum 15 mM HEPES 1:100 AB/AM 1:100 Fungizon in Medium 199 mit 1 M NaOH auf pH 7,4 einstellen
Endothelzellwachstumsfaktor	8,3% Newborn calf serum 1,67 mg/ml endothelial cell growth supplement (ECGS) 1250 U Heparin pro ml in Medium 199 steril filtrieren
Nabelschnurpuffer	1:100 AB/AM 1:100 Fungizon in PBS I
Gelatinelösung	1% Gelatine gelöst in deionisiertem, sterilem Wasser

2.1.3 Puffer und Lösungen

10 × TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer)	0,89 M Tris-Base 0,89 M Borsäure 25 mM Natrium-EDTA in deionisiertem Wasser (für RNA-Gel: DEPC-behandelt)
TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer)	10mM Tris-HCl (pH 8) 1 mM Natrium-EDTA in deionisiertem Wasser (für RNA-Gel: DEPC-behandelt)
Probenpuffer für Agarose-Gele	50% Glycerin 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 1 mM Natrium-EDTA 0,25% Bromphenolblau in deionisiertem Wasser (für RNA-Gel: DEPC-behandelt)
Lyse-Puffer (Proteine)	50 mM Tris-HCl, (pH 7,0) 1% (w/v) SDS Protease Inhibitor Cocktail P8340 (Sigma)
Sammelgel-Puffer (SDS-PAGE)	1 M Tris-HCl (pH 6,8)
Trenngel-Puffer (SDS-PAGE)	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)
4 × Lauf-Puffer (SDS-PAGE)	50 mM Tris-Base 380 mM Glycin 0,1% SDS
Transfer-Puffer (Western-Blot)	25 mM Tris-HCl (pH 8,2) 192 mM Glycin 20% Methanol 0,0375% SDS
TBS-T-Puffer	20 mM Tris-HCl (pH 7,5) 155 mM NaCl 0,1% Tween 20
Blockierungslösung (Western-Blot)	TBS-T-Puffer 3% Milchpulver
Ponceau-Lösung	0,5 % Ponceau 1% Essigsäure in Wasser
CsCl – Lösung	5,7 M CsCl 100 mM Natrium-EDTA 6 mM β -Mercaptoethanol (ME) in DEPC-behandeltem Wasser ansetzen, sterilfiltrieren und ME erst vor Gebrauch zusetzen

GTC - Lösung	4 M GTC 1% <i>N</i> -Lauroylsarcosyl 25 mM Natriumacetat (pH 6,0) 1 mM Natrium-EDTA 1 M β -Mercaptoethanol (ME) steril ansetzen und ME erst vor dem Gebrauch zusetzen
TSPE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,0) 1 % <i>N</i> -Lauroylsarcosyl 5 % Phenol 1 mM Natrium-EDTA in DEPC-behandeltem Wasser ansetzen und sterilfiltrieren
PFA-Lösung	5% PFA in PBS I lösen
Sucrose-Puffer (EMSA)	0,32 M Sucrose 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 3 mM CaCl ₂ 2 mM MgOAc 0,1 mM EDTA 0,5% NP-40 1 mM DTT (vor Gebrauch zugeben) Protease Inhibitor Cocktail P8340 (Sigma) Phosphatase Inhibitor Cocktail II P5726 (Sigma)
Niedrig-Salz-Puffer (EMSA)	20 mM HEPES (pH 7,9) 1,5 mM CaCl ₂ 20 mM KCl 0,2 mM EDTA 25% Glycerin (v/v) 0,5 mM DTT (vor Gebrauch zugeben) Protease Inhibitor Cocktail P8340 (Sigma) Phosphatase Inhibitor Cocktail II P5726 (Sigma)
Hoch-Salz-Puffer (EMSA)	20 mM HEPES (pH 7,9) 1,5 mM CaCl ₂ 800 mM KCl 0,2 mM EDTA 25% Glycerin (v/v) 1% NP-40 0,5 mM DTT (vor Gebrauch zugeben) Protease Inhibitor Cocktail P8340 (Sigma) Phosphatase Inhibitor Cocktail II P5726 (Sigma)
5 × Bindungspuffer (EMSA)	50 mM Tris-HCl (pH 8,0) 750 mM KCl 2,5 mM EDTA 0,5% Triton-X 100 62,5% Glycerin (v/v) 1 mM DTT (vor Gebrauch zugeben)

20 × PBS (pH 7,4) (ISH)	2,74 M NaCl 0,05 M KCl 0,2 M Na ₂ HPO ₄ 0,04 M KH ₂ PO ₄
20 × SSC (ISH)	3 M NaCl 0,3 M Na-Citrat pH 7,0 mit NaOH einstellen
Tris-Glycin-Puffer (ISH)	0,5 M Tris-Base 0,5 M Glycin
Hybridisierungspuffer (ISH)	40% Formamid 25% 20 × SSC 35% DEPC-H ₂ O
Hybridisierungslösung (ISH)	40% Formamid 25% 20 × SSC 1% 100 × Denhardt's 1% tRNA (10µg/µl) 1% Heringssperma (100µg/µl) 1% markierte RNA-Sonde in DEPC-H ₂ O 4 min bei 95°C denaturieren, auf Eis abkühlen
Posthybridisierungspuffer (ISH)	20% Formamid 2,5% 20 × SSC in DEPC-H ₂ O
100 × Denhardt's (ISH)	20 g Ficoll (Type 400, Pharmacia) 20 g Polyvenylpyrolidone 20 g BSA (Fraktion V, Sigma) in 1 l DEPC-H ₂ O lösen und steril filtrieren
NTMT-AP-Puffer (ISH)	100 mM Tris-HCl (pH 9,5) 100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂ 0,1% Tween 20
Färbelösung (ISH)	4,5 µl Nitroblautetrazonium 3,5 µl 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat 1 ml NTMT-AP-Puffer
10 × TBS (ISH)	250 mM Tris-HCl (pH 7,5) 1,37 M NaCl 0,03 M KCl

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung humaner Endothelzellen

Die Isolierung von Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) erfolgte durch Modifikation der Methode von Jaffe (Jaffe *et al.*, 1973).

Die Nabelschnur wurde direkt nach der Entbindung in Nabelschnurpuffer überführt und bei 4°C gelagert. Die Isolierung der Endothelzellen erfolgte unter sterilen Bedingungen bei Raumtemperatur. Alle Medien und Lösungen wurden auf 37°C temperiert. Die Zellkulturgefäße wurden mit Gelatinelösung beschichtet (1 h bei 37°C im CO₂-Inkubator). Anschließend wurde in die Vene der Nabelschnur von beiden Seiten eine Knopfkanüle mit Schlauchansatz eingeführt und befestigt. Die Vene wurde mit Hank's balanced salt solution (HBSS)-Lösung gespült und anschließend vollständig mit Collagenase-Lösung gefüllt. Beide Gefäßenden wurden verschlossen und die Nabelschnur in einem Becherglas mit vorgewärmtem PBS I für 11 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden durch Ausspülen mit Endothelzellmedium 10 aus den Gefäßen in ein 50 ml-Greiner-Röhrchen überführt und sofort bei 250g für 6 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml Endothelzellmedium 10 resuspendiert und in ein mit Gelatine vorbehandeltes Zellkulturgefäß überführt. Wurden Endothelzellen aus mehreren Nabelschnüren isoliert, so wurden alle resuspendierten Endothelzellen vereinigt, gemischt und dann auf eine entsprechende Anzahl Zellkulturgefäße verteilt. Die Endothelzellen wurden bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten CO₂-Atmosphäre (5% CO₂) kultiviert. Nach 1,5 h wurde das Medium entfernt und durch Endothelzellmedium 10 mit Endothelzellwachstumsfaktor (1:100) ersetzt und weiter im Inkubator kultiviert. Das Kulturmedium wurde alle 48 Stunden gewechselt.

Die Isolierung und Kultivierung der arteriellen Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUAEC) erfolgte wie oben beschrieben. Abweichend wurde statt Knopfkanüle mit Schlauchansatz eine Venenverweilkänüle (18G) mit Mandrin (18G) in die Arterien eingeführt. Nach der Präparation wurden die Zellen in EGM2[®]-MV-Medium (Clonetics) kultiviert.

Humane Endothelzellen aus der Koronararterie (HCAEC) wurde von Clonetics erworben und entsprechend der Anleitung des Herstellers bei 37°C im CO₂-Inkubator (5% CO₂) in EGM2[®]-MV-Medium kultiviert. Die Vermehrung erfolgte durch Passagieren, wobei die Zellen durch Trypsinierung von den Zellkulturschalen gelöst wurden und dann im Verhältnis 1 : 7 auf neue Zellkulturschalen ausgesät wurden. Die Versuche erfolgten mit Zellen der jeweils angegebenen Passage.

2.2.2 Applikation von Schubspannung auf Endothelzellen

Die Applikation von laminarer Schubspannung auf konfluente Endothelzellkulturen erfolgte mit Hilfe eines nach (Sdougos *et al.*, 1984) modifizierten Plattenkegel-Viskosimeters. 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. Die Plattenkegel-Viskosimeter-Apparatur ist schematisch in Abb. 2.1 dargestellt.

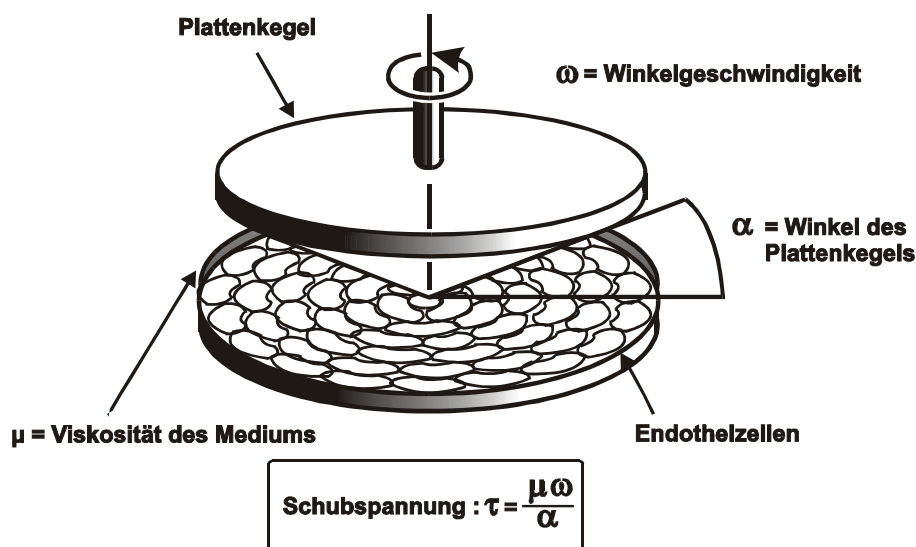


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Plattenkegel-Viskosimeter-Apparatur. Die Applikation von laminarer Schubspannung auf kultivierte Endothelzellen erfolgt durch einen rotierenden Plattenkegel mit einem Winkel α von $0,5^\circ$. Die Schubspannung ist außerdem von der Viskosität des Mediums und der 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 Schubspannung ist neben der Winkelgeschwindigkeit und dem Winkel α von $0,5^\circ$ des Plattenkegels von der Viskosität des Mediums abhängig. Die Zugabe von Dextran (Sigma, MG 71,4) erhöht die Viskosität des Endothelzellmediums 2,95-fach von 0,007 $\text{dyn} \cdot \text{s}/\text{cm}^2$ auf 0,02065 $\text{dyn} \cdot \text{s}/\text{cm}^2$ und vermeidet einen Medienverlust durch zu hohe Fliehkräfte. Bei jeder Probe wurde eine zeitgleiche interne stationäre Kontrolle mit gleichem Medium (mit bzw. ohne Dextran) analysiert.

2.2.3 RNA-Präparation

2.2.3.1 RNA-Präparation von Gewebeproben mittels CsCl-Methode

Die RNA-Präparation von Gewebeproben wurde mittels der CsCl-Methode nach Chirgwin durchgeführt (Chirgwin *et al.*, 1979).

Gewebeproben wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren, mechanisch zerkleinert und dann in GTC-Lösung suspendiert. Sie wurden dann mit einem Ultraturrax-Gerät homogenisiert.

Für die Präparation wurde 1 ml CsCl-Lösung in ein BECKMAN-Röhrchen gegeben und mit dem Homogenisat überschichtet. Die Röhrchen wurden mit GTC-Lösung austariert und bei 100.000g in einer BECKMAN-Ultrazentrifuge für 21 h bei 22°C zentrifugiert. Dabei sedimentiert die RNA durch das CsCl-Kissen, während Proteine und DNA im Gradienten verbleiben. Der Überstand wurde vorsichtig bis zum CsCl-Kissen abgenommen. Die CsCl-Lösung wurde dekantiert und das RNA-Pellet auf Eis in 400 µl TSPE-Puffer gelöst. Die RNA wurde durch Zugabe von 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 6,0) und 10 ml 96%igem Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Die RNA wurde durch Zentrifugation bei 10.000g für 30 min bei -10°C sedimentiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in 300 µl DEPC-behandeltem Wasser gelöst und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die RNA wurde erneut über Nacht mit 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat und 2,5 Vol. 96%igem Ethanol bei -20°C gefällt und dann für 30 min bei 10.000g und -10°C sedimentiert. Das Pellet wurde zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen und danach in einem Geschwindigkeitsvakuumkonzentrierer (speed vac) für 5 min getrocknet. Abschließend wurde die RNA in 50 µl DEPC-behandeltem Wasser gelöst und ihre Konzentration spektrophotometrisch bestimmt.

Zur Kontrolle der RNA wurde 1 µl Gesamt-RNA in einem 0,8%igem Agarose-Gel aufgetrennt.

2.2.3.2 RNA-Präparation von Zellkulturen mittels TriReagent™ (Sigma)

Die Präparation der RNA aus Zellkulturen erfolgte mittels TriReagent™ nach Anleitung des Herstellers. Dazu wurden die Zellkulturschalen je zweimal mit PBS I gewaschen und anschließend mit 600µl TriReagent™ die RNA isoliert. Die erhaltene RNA wurde in 50 µl DEPC-behandeltem Wasser gelöst und ihre Konzentration spektrophotometrisch bestimmt. Zur Kontrolle der RNA wurde 1 µl Gesamt-RNA in einem 0,8%igem Agarose-Gel aufgetrennt.

2.2.4 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration durch Absorption

Um Qualität und Quantität von DNA- und RNA-Proben zu bestimmen, wurde nach Verdünnung (1:50) die Absorption bei 260 nm und 280 nm gemessen. Zusätzlich kann eine Hintergrundkompensation bei 320 nm erfolgen. Das Verhältnis A_{260}/A_{280} ist der Reinheitskoeffizient und gibt über die Verunreinigungen mit Proteinen Aufschluss. Er sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen (Sambrook *et al.*, 1989; Ausubel *et al.*, 1997).

Die Nukleinsäurekonzentration wurde mit Hilfe folgender Koeffizienten bestimmt:

1 A_{260} -Einheit = 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngige DNA

1 A_{260} -Einheit = 37 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngige DNA

1 A_{260} -Einheit = 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA

2.2.5 Reverse Transkription

Zur anschließenden Amplifikation von Zielgenen wurde RNA durch reverse Transkription (RT) in cDNA umgeschrieben. Die RT erfolgte mit random hexamer-Primern und SuperScript II RNase H⁻ reverse transcriptase.

RT-Ansatz (25 μl):

- 5 μl RNA (100 ng/ μl)
- 4 μl random hexamer Primer (30 ng/ μl)
- 6 μl DEPC-H₂O

Inkubation des Ansatzes für 3 min bei 72°C, Abkühlung auf 4°C, anschließend Zugabe von:

Reaktions-Mix (10 μl):

- 5 μl 5 × first strand buffer
- 1 μl dNTP (je 12,5 mM)
- 0,25 μl Dithiothreitol (DTT, 100 mM)
- 0,5 μl RNase OUT™ Ribonuclease Inhibitor (40 U/ μl)
- 0,25 μl SuperScript™ II reverse transcriptase (2 U/ μl)
- 3 μl DEPC-H₂O

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

2.2.6 Polymerasekettenreaktion

Die Methode der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde zur Amplifikation revers transkribierter cDNA genutzt (Mullis *et al.*, 1987).

PCR-Ansatz (25 μ l):

- 2,5 μ l 10 \times Taq-Reaktionspuffer
- 5 μ l dNTP (je 0,1 mM)
- 1 μ l sense-Primer (10 pmol/ μ l)
- 1 μ l antisense-Primer (10 pmol/ μ l)
- 0,3 μ l Taq-DNA-Polymerase (4 U/ μ l)
- 2 μ l RT-Ansatz mit cDNA
- 13,2 μ l steriles deionisiertes Wasser

Dieser Ansatz wurde mit ca. 50 μ l Mineralöl (3 Tropfen) überschichtet und die cDNA nach einer initialen Denaturierung bei 95°C für 1 min mit einem 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. 2.1 zusammengefasst.

2.2.7 Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Auftrennung von DNA bzw. die Kontrolle der RNA-Integrität erfolgte in 0,8% - 1,4%igen Agarose-Gelen mit Ethidiumbromid (100 ng/ml) in 1 \times TBE-Puffer bei 8-10 V/cm Laufstrecke in Standard-Elektrophorese-Apparaturen (Sambrook *et al.*, 1989). Die Nukleinsäuren wurden dabei mit 0,1 Volumen Probenpuffer versetzt. Die Länge linearer DNA-Fragmente wurde mit Hilfe parallel aufgetrennter DNA-Längenstandards (100 bp bzw. 1 Kilobasenpaar-Leiter, Invitrogen) bestimmt. Die DNA bzw. RNA wurde mit Hilfe eines UV-Transilluminators nachgewiesen und mit Polaroidfilm Typ 665 fotografiert.

Tab. 2.1: Genspezifische Primersequenzen und PCR-Protokolle.

Gen	Primer	5'-3'-Primersequenzen	Annealing-Temperatur	PCR-Zyklen
18S rRNA	sense	GTTGGTGGAGCGATTTGTCTGG	60°C	11
	antisense	AGGGCAGGGACTTAATCAACGC		
GAPDH	sense	CATCACCATCTTCCAGGAGCG	60°C	18
	antisense	TGACCTTGCCCACAGCCTTG		
Ephrin-B2	sense	GGGAGGCACTCGCTGTTATC	65°C	24
	antisense	GGGAGGGGGATCTGACCTAC		
EphB4	sense	TGTCACCACTGACCGAGAGG	66°C	27
	antisense	ACTGCGACCACAATGACCAC		
Angiopoietin-2	sense	TGGCAGCGTTGATTTTCAGAG	64°C	26
	antisense	CGTTGTCTCCATCCTTTGTGC		
Tie2	sense	TGTCTCTGCTCTCCAGGATGG	64°C	25
	antisense	TGTTCACACTGCAGACCCAAA		
ACE	sense	GCAGCCACTCTACCTCAACC	65°C	35
	antisense	CAGGTCCTCCAAGTTCACG		
ppET-1	sense	TGCTCCTGCTCGTCCCTGATGGATAAAGAG	60°C	32
	antisense	GGTCACATAACGCTCTCTGGAGGGCTT		
ECE-1	sense	ACTTCCACAGCCCCGGAGT	68°C	30
ECE-1a	sense	AGACAGGAGGCAGCCCTGAT	68°C	33
ECE-1b	sense	ACAGCATGCGGGGCGTGT	68°C	35
ECE-1c	sense	CGGAGCACGCGAGCTATG	68°C	30
ECE-1d	sense	GGCGCGAGAGCCATGGAG	68°C	32
ECE-1	antisense	GGTTGGCCTTGATCCAGC	68°C	
ET _A	sense	CACTGGTTGGATGTGTAATC	58°C	27
	antisense	AGAGGGAACCAGCAAAGAGC		
ET _B	sense	CGAGCTGTTGCTTCTTGGAGTAG	69°C	27
	antisense	ACGGAAGTTGTCATATCCGTGAT		
eNOS	sense	GGAACCTGTGTGACCCTC	65°C	40
	antisense	CCACGTCATACTCATCCA		
eNOS (rat)	sense	CTGCGCTGGTATGCCCTCC	60°C	32
	antisense	AAGAGCCTCCCCAGCTGCTG		
iNOS (rat)	sense	TACATGGGCACCGAGATTGG	64°C	34
	antisense	TGAAGGCGTAGCTGAACAAGG		
ppET-1 (rat)	sense	TCTTCTCTCTGCTGTTTGTG	64	34
	antisense	TTAGTTTTCTTCCCTCCACC		

2.2.8 Elution von Nukleinsäuren

DNA- oder RNA-Fragmente spezifischer Größe können nach Elektrophorese auf dem UV-Transilluminator aus dem Agarose-Gel herausgeschnitten und die Nukleinsäuren durch Elution isoliert werden. Die DNA-Fragmente im Gelstück wurden durch Elektroelution aus dem Gelstück in einen Dialyseschlauch (Spectra/Por[®] 6, MWCO 1.000, Roth) in einer Elektrophorese-Apparatur mit anschließender Ethanolpräzipitation isoliert.

2.2.9 Klonierung von DNA-Fragmenten

Die Klonierung von eluierten PCR-Fragmenten in Plasmidvektoren erfolgte mit dem TOPO[™] TA Cloning[®] Kit (pCR[®]II-TOPO[®], Invitrogen). Die in den Klonierungsvektor ligierten PCR-Fragmente wurden in kompetente Bakterien (TOP10F' One Shot[®] *E.coli*) transformiert. Die rekombinanten Bakterien wurden durch 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal)-Selektion auf LB-Agarplatten mit 100 μ g/ml Ampicillin, 50 μ l X-Gal-Stammlösung (50 mg/ml) und 25 μ l Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG)-Stammlösung (100 mM) identifiziert.

2.2.10 Plasmid-DNA-Präparation

Rekombinante Bakterien wurden in LB-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin über Nacht bei 37°C, kultiviert. Nach dem Erreichen der stationären Phase wurden die Bakterien sedimentiert (10 min, 5000g). Die Plasmid-DNA-Isolation (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).

2.2.11 DNA-Sequenzierung

Eluierte DNA-Fragmente und linearisierte Plasmide wurden überlappend auf beiden Strängen durch Modifikation der Methode von (Sanger *et al.*, 1977) mit dem Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech) 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 dem DNA-Programm GeneRunner (Hastings Software) analysiert und mit DNA-Sequenz-Datenbanken (Altschul *et al.*, 1997) verglichen.

2.2.12 Transkriptionsfaktoranalyse mittels EMSA (electrophoretic mobility shift assay)

2.2.12.1 Präparation der Kernextrakte

Für die Analyse der Bindungsaktivität von Transkriptionsfaktoren wurden Kernextrakte hergestellt. Dazu wurden die Zellen spezifisch behandelte Proben zweifach mit PBS I (37°C) gewaschen. Die Zellen wurden in 1 ml PBS I (4°C) von den Kulturschalen abgeschabt und durch Zentrifugation (10 min, 500g bei 4°C) sedimentiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 100 µl Sucrose-Puffer aufgenommen und die Zellen vorsichtig resuspendiert. Durch den Puffer wird die Integrität der Zellmembranen aufgelöst und das Zytosol freigesetzt, ohne die Zellkerne zu zerstören. Die Zellkerne wurden durch Zentrifugation (15 min, 500g bei 4°C) gesammelt. Der Überstand enthält die zytosolische Proteinfraction und wurde für weitere Analysen bei -80°C gelagert. Das Zellkernpellet wurde einmal mit 500 µl Sucrose-Puffer ohne NP-40 gewaschen. Das gewaschene Zellkernpellet wurde mit 30 µl hypotonem Niedrig-Salz-Puffer versetzt und die Kerne vorsichtig resuspendiert. Der Suspension wurde in 5 µl Aliquots 30 µl Hoch-Salz-Puffer zugegeben und anschließend 30 min auf Eis unter Schütteln inkubiert. Dadurch wird das Kernplasma extrahiert, während die Kernhülle intakt bleibt und die genomischen DNA zurückhält. Die verbleibende Kernhülle wurde von den Kernextrakten durch Zentrifugation (30 min, 10.000g bei 4°C) separiert. Die erhaltenen Kernextrakte wurden in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.12.2 Herstellung von radioaktiv markierten Oligonukleotid Proben

Für die Herstellung doppelsträngiger endmarkierter Oligonukleotid-Proben wurden einzelsträngige Oligonukleotide mit den entsprechenden Bindungsstellen in sense- und antisense-Orientierung synthetisiert (MWG-Biotech). Diese Oligonukleotide wurden durch den T4-Kinase-Kit (Amersham) endständig mit γ -ATP markiert.

Markierungsreaktionsansatz:

- 5 μ l 10 \times Kinase-Puffer
- 3 μ l T4 Kinase (1:10 in Dilutionpuffer verdünnt)
- 1 μ l Oligonukleotid (100 ng/ μ l)
- 1,5 μ l γ -³²P-ATP (10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol)
- 42,5 μ l Wasser

Der Reaktionsansatz wurde für 45 min bei 37°C inkubiert und abschließend die Kinase durch eine 5-minütige Inkubation bei 65°C inaktiviert. Die nicht eingebauten radioaktiven Nukleotide wurden mittels G25-Säulen (Amersham) nach Anleitung des Herstellers abgetrennt. Die markierten Oligonukleotide wurden im Szintillationszähler gemessen und die Konzentration auf 25.000 cpm/ μ l eingestellt. Identische Volumina der jeweiligen sense- und antisense-Oligonukleotide wurden gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, um eine doppelsträngige Probe herzustellen. Analog wurden unmarkierte Kontroll-Oligonukleotide sowie Oligonukleotide, die in der Basenabfolge der Bindungsstelle mutiert waren, behandelt. Die Oligonukleotid-Proben wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.12.3 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Für die electrophoretic mobility shift assays wurden folgende Bindungsreaktionen angesetzt:

Bindungsreaktion:	3 μ l 5 \times Bindungspuffer
	1,5 μ l poly dIdC (1 μ g/ μ l) Sigma
	1,5 μ l markierte Probe (25.000 cpm/ μ l)
	8 μ l Kernextrakt
	1 μ l Wasser

In Kontrollreaktionen wurden die Kernextrakten 30 min vor Zugabe zur Bindungsreaktion mit nichtmarkierten Proben bzw. nichtmarkierten mutierten Proben inkubiert. Die verwendeten Oligonukleotidsequenzen sind in Tab. 2.2 zusammengefasst.

Die Bindungsreaktion wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend elektrophoretisch (2 h bei 1000 V) im Polyacrylamidgel aufgetrennt. Für die shift assays wurden 5%ige nichtdenaturierende Polyacrylamidgele in 0,5% TBE-Puffer hergestellt. Als Laufpuffer wurde 0,5% TBE verwendet. Vor dem Auftragen der Proben wurden die Gele eine Stunde mit 300 Volt equilibriert.

Tab. 2.2: Oligonukleotidsequenzen für electrophoretic mobility shift assay

Transkriptionsfaktor	Oligo	5'-3'-Oligonukleotidsequenzen
AP-1	sense	CGCTTGATGACTCAGCCGGAA
	antisense	TTCCGGCTGAGTCATCAAGCG
AP-1 (mutiert)	sense	CGCTTGATGACTTGGCCGGAA
	antisense	TTCCGGCCAAGTCATCAAGCG
SP-1	sense	ATTCGATCGGGGCGGGGCGAGC
	antisense	GCTCGCCCCGCCCGATCGAAT
SP-1 (mutiert)	sense	ATTCGATCGGTTTCGGGGCGAGC
	antisense	GCTCGCCCCGAACCGATCGAAT
NF κ B	sense	AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC
	antisense	GCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT
NF κ B (mutiert)	sense	AGTTGAGGCGACTTTCCCAGGC
	antisense	GCCTGGGAAAGTCGCCTCAACT
CREB	sense	AGAGATTGCCTGACGTCAGAGAGCTAG
	antisense	CTAGCTCTCTGACGTCAGGCAATCTCT
CREB (mutiert)	sense	AGAGATTGCCTGTGGTCAGAGAGCTAG
	antisense	CTAGCTCTCTGACCACAGGCAATCTCT

2.2.13 *in situ*-Hybridisierung (ISH)

Bei der *in situ*-Hybridisierung müssen alle benutzten Geräte und Lösungen RNase frei sein. Die eingesetzten Sonden wurden mit dem Digoxigenin Labeling-Kit von Roche markiert und freundlicherweise von Gudrun Dandekar vom Institut für Tumorbilogie in Freiburg zur Verfügung gestellt. Die eingesetzten Gewebe wurden in 4% Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Schnitte wurden auf SuperFrost®Plus (Menzel-Gläser) Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 42°C inkubiert.

Um die Gewebe für die Hybridisierung zugänglich zu machen, wurden die Schnitte entparaffiniert (absteigende Alkoholreihe). Dazu wurden sie zweimal für 10 min mit Xylol, zweimal für 5 min in Ethanol (100%) und dann je 1 min in Ethanol absteigender Konzentration (95%, 90%, 80%, 70%, 50%, 30%) behandelt. Anschließend wurden die Schnitte für 5 min in PBS gewaschen, für 30 min in 4% Paraformaldehyd in PBS nachfixiert und erneut zweimal für je 5 min in PBS gewaschen.

Um die Schnitte für die RNA-Sonde besser zugänglich zu machen, wurden sie partiell mit Proteinase K (25 µg/ml in PBS) für 3 min verdaut. Der Verdau wurde durch zweimaliges Waschen für 5 min mit PBS gestoppt. Anschließend wurden die Schnitte nochmals für 15 min mit 4% Paraformaldehyd nachfixiert und abschließend zweimal in PBS für 5 min gewaschen.

Vor der auf die Hybridisierung wurden die Schnitte zweimal für 5 min in 2 × SSC sowie für 30 min in Tris-Glycin-Puffer inkubiert.

Die Schnitte wurden dann mit je 60 µl Hybridisierungslösung bedeckt und in einer mit Hybridisierungspuffer befeuchteten Kammer über Nacht bei 65°C inkubiert.

Zur Entfernung nichthybridisierter einzelsträngiger RNA wurden die Schnitte nach der Hybridisierung mit RNase A behandelt. Dazu wurden die Schnitte dreimal für 15 min mit 5 × SSC gewaschen, für 40 min bei 60°C in Posthybridisierungspuffer inkubiert und für 15 min in 2 × SSC gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für 15 min bei 37°C mit RNase A (12,5 mg/l in 2 × SSC) behandelt. Abschließend wurden sie einmal für 15 min mit 2 × SSC gewaschen, für 20 min bei 60°C in Posthybridisierungspuffer inkubiert und zweimal für 15 min mit 2 × SSC gewaschen.

Die hybridisierten, digoxigeninmarkierten Sonden wurden dann mit dem Digoxigenin Nucleic Acid Detection-Kit (Roche) nachgewiesen. Dazu wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C in einer mit 2 × SSC befeuchteten Kammer mit einem α-DIG-AP-Fab Antikörper (1 : 4000 in 1%iger Blockierungslösung aus dem Kit) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte intensiv (mindestens 4 h mit häufigem Wechsel des Puffers) mit TBS gewaschen und danach

dreimal für je 10 min mit NTMT AP-Puffer inkubiert. Der Nachweis der Sonden erfolgte durch Inkubation der Schnitte im Dunkeln mit der Färbelösung, wobei die an den Antikörper gekoppelte Alkalische Phosphatase (AP) den löslichen Farbstoff in ein unlösliches Farbstoffpräzipitat umwandelt.

Die Färbereaktion wurde durch dreimaliges Waschen der Schnitte mit EDTA (1 mM in PBS) beendet. Abschließend wurden die Schnitte dehydriert (aufsteigende Alkoholreihe, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% Ethanol, Rotihistol) und mit Entellan (Merck) eingebettet.

Als Sonden wurden *in vitro* RNA-Transkripte von der humanen Ephrin-B2-mRNA (kodierende Sequenz Basenpaar 7 – 1028 in pcDNA3 kloniert) hergestellt. Für die antisense-Sonde wurde das Plasmid mit BamHI geschnitten und mit SP6-RNA-Polymerase transkribiert. Für die sense-Sonde (negative Kontrolle) wurde das Plasmid mit Not I verdaut und mit T7-RNA-Polymerase transkribiert.

2.2.14 Proteinpräparation

Die Zellen wurden zweimal mit PBS-Puffer gewaschen und mit 100 µl/60 mm Kulturschale Lyse-Puffer lysiert. Die Proben wurden für 10 min bei 95°C denaturiert und anschließend die DNA durch Sedimentation (6000g für 10 min bei 4°C) abgetrennt. Die Konzentration der Proteine im Überstand wurde mit dem BCATM Protein Assay (Pierce, Rockfort, USA) bestimmt.

2.2.15 Western-Analyse

Die Proteine wurden auf 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen mit einem Protein-Molekulargewichtsmarker (BENCHMARKTM; Invitrogen) in einer Mini-Protean II cell-Apparatur (BioRad) elektrophoretisch aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrocellulose-Membran (0,45 µm; Schleicher & Schuell, Dassel) transferiert. Dazu wurde das Mini Trans-Blot Transfer Cell-System (BioRad) verwendet. Der Transfer erfolgte bei 4°C mit 200 mA für 45 min. Die Nitrocellulose-Membran wurde in TBS-T-Lösung mit 3% Blotto (Santa Cruz Biotechnology) für 1 Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit spezifisch in Blockierungslösung verdünnten kommerziellen primären Antikörpern über Nacht bei 4°C. Die Detektion der gebundenen spezifischen Antikörper erfolgte mit einem sekundären horseradish peroxidase-linked rabbit immunoglobulin (Santa Cruz Biotechnology) durch Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation mit primärem sowie sekundärem Antikörper wurde die Membran jeweils 5-mal in TBS-T-Lösung für 5 min gewaschen. Die Aktivität der Peroxidase wurde mit dem ECL (enhanced chemiluminescence) Western blotting detection reagent (Amersham Pharmacia Biotech) nachgewiesen.

2.2.16 Statistik

Die Ergebnisse werden als Mittelwert ± Standardfehler angegeben. 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, SPSS Science). Ein Wert von $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der Regulation des Endothelin(ET)-Systems im kardiovaskulären System *in vitro* und *in vivo*. Einen Schwerpunkt bildet dabei das Endothelin-Konvertierungs-Enzym-1 (ECE-1). Zahlreiche Experimente untersuchen insbesondere eine potentielle Wechselwirkung zwischen dem Renin-Angiotensin-System (RAS) und dem ET-System. Die bereits publizierten Daten werden dabei in komprimierter Form im Ergebnisteil dargestellt. Der zweite Teil fasst die Ergebnisse zur Regulation von Mediatoren der Gefäßbildung und -integrität durch biomechanische Kräfte in Endothelzellen zusammen.

3.1 Einfluss von Angiotensin II auf die Expression von ECE-1-Isoformen

In ersten Experimenten wurde der Einfluss von Angiotensin II auf die mRNA-Expression von ECE-1-Isoformen in humanen Endothelzellen (HUVEC) untersucht. Um einen Effekt des Serums im Zellkulturmedium auf die ECE-1-Expression auszuschließen, wurden konfluente HUVEC's für 24 h in Endothelzellmedium 0,5 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit Angiotensin II sowie mit dem Angiotensin-Typ I Rezeptor Antagonisten Candesartan (Astra) inkubiert. Die RNA der Zellen wurde präpariert und mittels RT-PCR analysiert. Dabei wurde kein Einfluss des Serumgehaltes des Zellkulturmediums auf die ECE-1-Expression nachgewiesen.

Zur Quantifizierung der Expression von ECE-1-Isoformen wurde mittels Linker-Primer-PCR ein DNA-Multi-Standard für alle vier ECE-1-Isoformen konstruiert, kloniert, sequenziert und gereinigt. Der Standard wurde in seriellen Verdünnungen bekannter Konzentration in kompetitiven PCR-Reaktionen eingesetzt. Durch die Wahl ECE-1-Isoform-spezifischer Primer, konnte in den gleichen Proben die Expression der Isoformen, sowie die ECE-1-Gesamtexpression quantifiziert werden. Die Ergebnisse nach Stimulation von primären humanen Endothelzellen (HUVEC) für unterschiedliche Zeiten (1, 3, 7, 24 Stunden) mit 1µM Angiotensin II sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Vergleichbare Ergebnisse wurden mit 100 nM Angiotensin II erhalten. Die Expression der ECE-1-Isoformen wird durch Angiotensin II nicht reguliert.

Tab. 3.1: Expression der ECE-1-Isoformen in HUVEC nach Inkubation mit Angiotensin II

amol/ μ g RNA	1 Stunde		3 Stunden		7 Stunden		24 Stunden	
	Kontrolle	Ang II [1 μ M]	Kontrolle	Ang II [1 μ M]	Kontrolle	Ang II [1 μ M]	Kontrolle	Ang II [1 μ M]
ECE-1	7,1 \pm 2,6	6,8 \pm 1,2	6,6 \pm 1,5	5,1 \pm 1,2	5,3 \pm 0,6	3,9 \pm 1,0	4,5 \pm 1,5	3,5 \pm 0,6
Prozent K.	100 \pm 36	95 \pm 17	100 \pm 23	77 \pm 17	100 \pm 12	74 \pm 18	100 \pm 34	78 \pm 13
ECE-1a	4,5 \pm 2,8	5,2 \pm 3,1	4,6 \pm 3,2	3,3 \pm 1,2	3,4 \pm 0,3	2,4 \pm 0,7	3,1 \pm 0,8	1,9 \pm 0,1
Prozent K.	100 \pm 62	116 \pm 69	100 \pm 69	120 \pm 27	100 \pm 8	80 \pm 20	100 \pm 26	78 \pm 5
ECE-1b	0,17 \pm 0,04	0,14 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01	0,11 \pm 0,01	0,16 \pm 0,04	0,10 \pm 0,02	0,11 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01
Prozent K.	100 \pm 23	82 \pm 7	100 \pm 9	73 \pm 6	100 \pm 24	62 \pm 13	100 \pm 3	66 \pm 7
ECE-1c	2,7 \pm 1,0	2,6 \pm 1,1	2,3 \pm 0,7	1,6 \pm 0,4	2,4 \pm 0,5	1,4 \pm 0,5	1,4 \pm 0,3	1,3 \pm 0,4
Prozent K.	100 \pm 37	94 \pm 40	100 \pm 32	72 \pm 19	100 \pm 23	57 \pm 20	100 \pm 22	92 \pm 28
ECE-1d	0,49 \pm 0,17	0,70 \pm 0,14	0,24 \pm 0,01	0,22 \pm 0,02	0,27 \pm 0,15	0,34 \pm 0,17	0,45 \pm 0,26	0,51 \pm 0,24
Prozent K.	100 \pm 35	142 \pm 29	100 \pm 33	92 \pm 7	100 \pm 53	126 \pm 64	100 \pm 58	114 \pm 54

Die konfluenten Zellen wurden für 24 h in Endothelzellmedium 0,5 kultiviert und dann für 1, 3, 7 und 24 Stunden mit Angiotensin II (1 μ M) inkubiert. Zellen der jeweils gleichen Präparation wurden als interne Kontrolle für die gleichen Zeiträume ohne Angiotensin II inkubiert. In der präparierten Gesamt-RNA wurden durch kompetitive RT-PCR die mRNA-Expression der ECE-1-Isoformen analysiert. (n = 3, alle Werte in amol/ μ g RNA \pm SEM, Prozent K. = Prozent der jeweils ohne Angiotensin II inkubierten Kontrolle)

3.2 Einfluss von Angiotensin II auf die Endothelin-1-Peptid-Bildung in HUVEC

Um eine mögliche funktionelle Aktivierung der Endothelin-1-Peptid-Bildung durch Angiotensin II zu untersuchen, wurden konfluente HUVEC's nach Vorinkubation für 24 Stunden in Endothelzellmedium 0,5 analysiert. Die HUVEC's wurden 3 bzw. 6 h mit Angiotensin II (100nM, 1µM) stimuliert. In weiteren Experimenten wurden die Zellen nach 30 minütiger Vorinkubation mit einem Angiotensin-Rezeptor Typ 1-Antagonisten (Losartan, 1µM Merck, Sharp & Dohme) mit Angiotensin II (1µM) inkubiert. Die Endothelin-Bildung wurde im Überstand bestimmt (Biotrak ET-1 ELISA, Amersham) und auf den Proteingehalt (BCA, Pierce) normalisiert. In Abb. 3.1 sind die Werte nach 3 bzw. 6 h dargestellt.

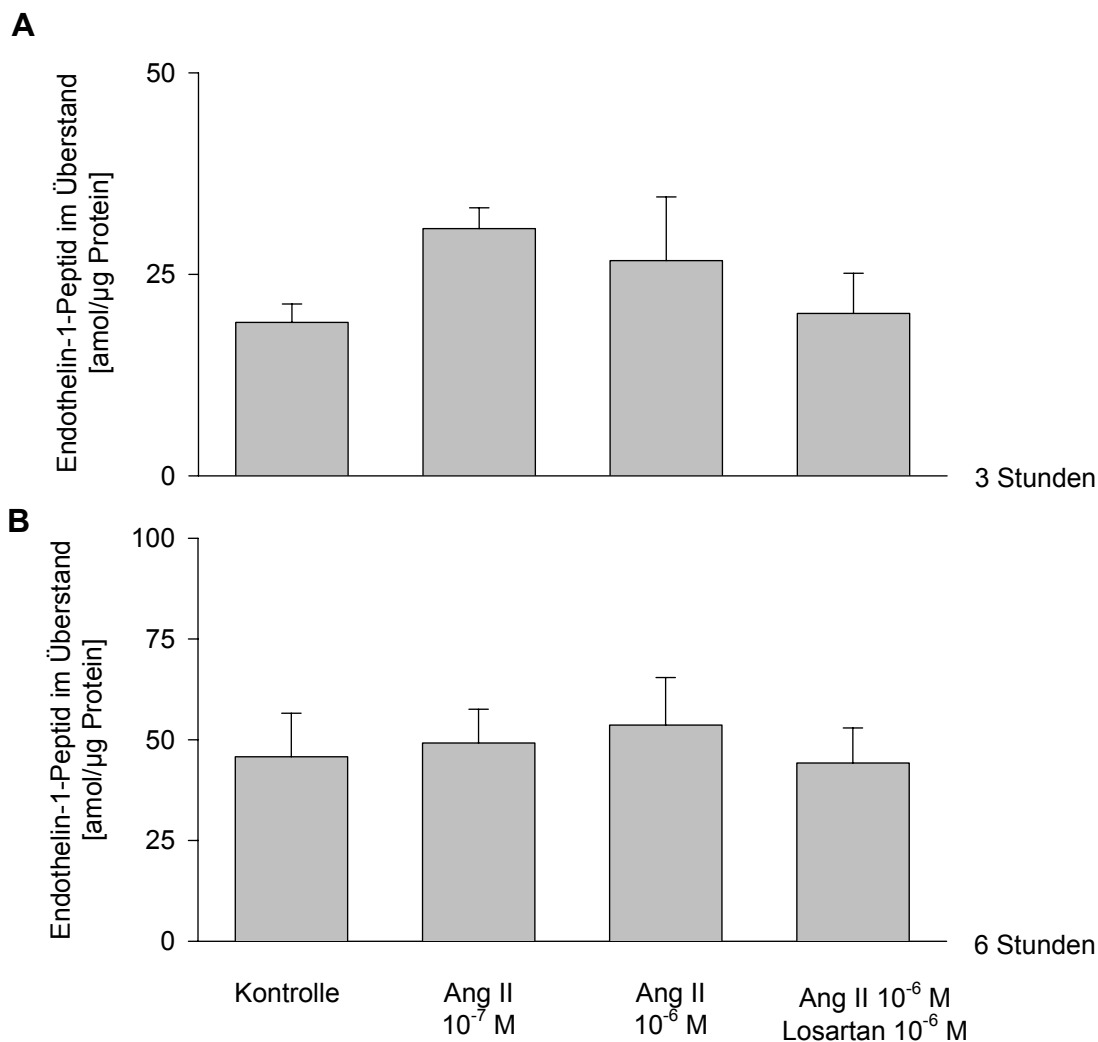


Abb. 3.1: Endothelin-1-Peptid-Bildung im Zellkulturüberstand von HUVEC's nach Angiotensin II-Stimulation. HUVEC's wurden für 24 h in Endothelzellmedium 0,5 nach Konfluenz kultiviert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit Angiotensin II (100nM, 1µM). Einige Proben wurden nach einer 30 minütigen Vorinkubation mit Losartan (1µM) mit Angiotensin II (1µM) behandelt. Nach 3 (A) und 6 (B) Stunden wurden Aliquots des Zellkulturüberstands abgenommen, der Proteingehalt und die Endothelin-1-Peptid-Bildung bestimmt. (n = 4)

3.3 Einfluss von Angiotensin II auf das Endothelin-System in HCAEC

Um den Einfluss von Angiotensin II auf das Endothelin-System in einem für die Arteriosklerose klinisch relevanten Zelltyp zu untersuchen, wurden zusätzlich humane Endothelzellen aus der Koronararterie (HCAEC, Clonetics) untersucht. Dabei wurde die Wirkung von Angiotensin II in konfluenten Zellkulturen der maximal verfügbaren 4. Passage analysiert. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Angiotensin II-Konzentrationen (10nM, 100nM, 1µM) behandelt. Die Gesamt-RNA wurde präpariert und die Expression von ppET-1, ECE-1, ECE-1a, ECE-1c und Endothelin-Rezeptor Typ B mittels RT-PCR bestimmt (n = 3). Für keines der Gene wurde eine signifikante Änderung der Expression durch die Behandlung mit Angiotensin II im Gegensatz zu den unbehandelten internen Kontrollen gefunden. In weiteren Versuchen wurden HCAEC mit zwei Angiotensin II-Konzentrationen (100nM, 1µM) für unterschiedliche Zeiten inkubiert (1, 3, 5, 7, 12 Stunden; n = 3). Auch in diesen zeitabhängigen Untersuchungen konnte keine Beeinflussung der Expression von ppET-1, ECE-1, ECE-1a, ECE-1c oder Endothelin-Rezeptor Typ B durch die Behandlung mit Angiotensin II in Endothelzellen nachgewiesen werden.

3.4 Untersuchungen zu Risikofaktoren der Arteriosklerose in Tiermodellen – Auswirkungen auf das Endothelin-System

In weitergehenden Untersuchungen wurden Gene des Renin-Angiotensin-Systems bzw. des Endothelin-Systems in Tiermodellen der Arteriosklerose-Entstehung untersucht. In Zusammenarbeit mit dem Labor von PD Dr. Matthias Barton (Universitäts-Hospital Zürich) wurden in einem Maus-Modell männliche C57B2/6J-Mäuse untersucht, die durch fettreiche Nahrung den proarteriosklerostischen Risikofaktor Übergewicht ausgeprägt haben. In einem Rattenmodell wurde der Risikofaktor Alter untersucht. Dabei wurden junge (2 – 6 Monate) und alte (24 Monate) WKY-Ratten analysiert. In einem transgenen Maus-Modell, das durch Überexpression von Erythropoietin (EPO) exzessive Erythrozytose zeigt, wurde in Zusammenarbeit mit dem Labor von Prof. Dr. Gassmann (Universität Zürich) die Aktivität des Endothelin-Systems untersucht.

3.4.1 Übergewicht aktiviert gewebespezifisch das Angiotensin-Konvertierungs-Enzym (ACE) ohne dessen mRNA-Expression zu beeinflussen

Der Einfluss von Übergewicht auf das Renin-Angiotensin- und Endothelin-System wurde in männlichen C57B2/6J Mäuse (drei Gruppen, jeweils n = 10) untersucht. Die Kontrollgruppe erhielt 30 Wochen Normalfutter. Zwei weitere Gruppen wurden mit einer fettreichen Nahrung (Western-Typ-Diät) gefüttert. Davon erhielt eine Gruppe zusätzlich einen Endothelin-Rezeptor-Typ A-Antagonisten (LU 135252, 50 mg/kg Körpergewicht pro Tag). Nach 30 Wochen wurden Blut- sowie Organproben entnommen. In der Niere der übergewichtigen Tiere wurde das Angiotensin-Konvertierungs-Enzym (ACE) aktiviert. Diese ACE-Aktivierung wurde durch Gabe des Endothelin-Rezeptor-Typ A-Antagonisten verhindert. Wir konnten in RT-PCR-Analysen zeigen, dass diese Aktivierung in der Niere nicht transkriptionell mediiert ist (Abb. 3.2) (Barton *et al.*, 2000a; Barton *et al.*, 2000b).

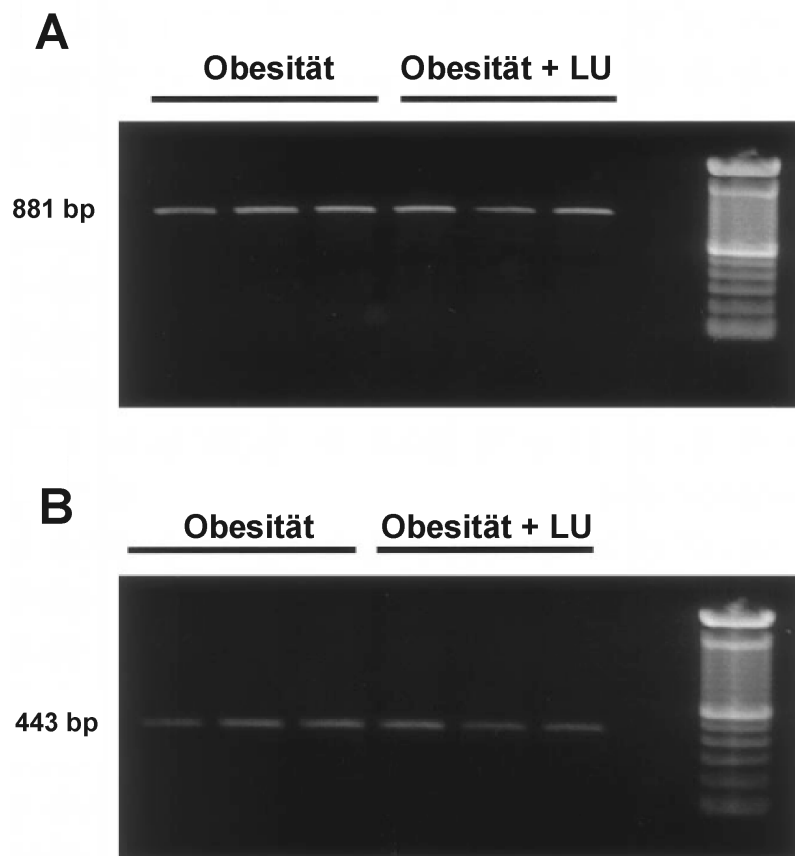


Abb. 3.2: Expression des Angiotensin-Konvertierungs-Enzyms- (ACE) und der Glycerin-Aldehyd-Dehydrogenase (GAPDH)-mRNA in der Niere. A Renale ACE-mRNA-Expression (881 bp Transkript). B GAPDH-mRNA-Expression (443 bp Transkript).

3.4.2 Erhöhte Expression von Endothelin-1 in Arterien alter Tiere

Der Einfluss des Risikofaktors Alter auf die Gefäßintegrität und die Expression von ppET-1 wurde in Gefäßen von jungen (2 – 6 Monate) und alten (24 Monate) WKY-Ratten analysiert. Blutdruckunabhängig wurde im Alter der Endothelin-1-Peptidgehalt in allen untersuchten Gefäßen fast verdoppelt. Wir konnten durch RT-PCR-Analysen zeigen, dass die vermehrte Endothelin-1-Synthese auf einer erhöhten ppET-1-mRNA-Expression beruht (Abb. 3.3) (Goettsch W. *et al.*, 2001).

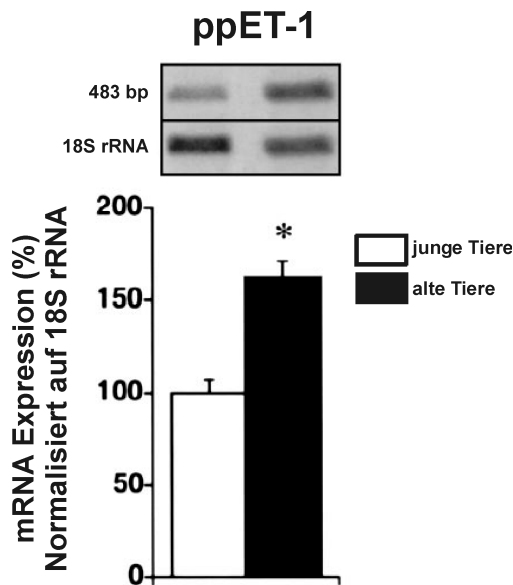


Abb. 3.3:
Vaskuläre ppET-1-mRNA-Expression. Die ppET-1-mRNA-Expression wurde in der Aorta von jungen (n=6) und alten Ratten (n=8) bestimmt und auf die 18S rRNA-Expression normalisiert. (Daten als Prozent der Expression in jungen Tieren \pm SEM; * $p < 0,05$)

Ebenfalls deutlich erhöht war die eNOS- und iNOS-mRNA-Expression in der abdominalen Aorta der alten Tiere (Abb. 3.4).

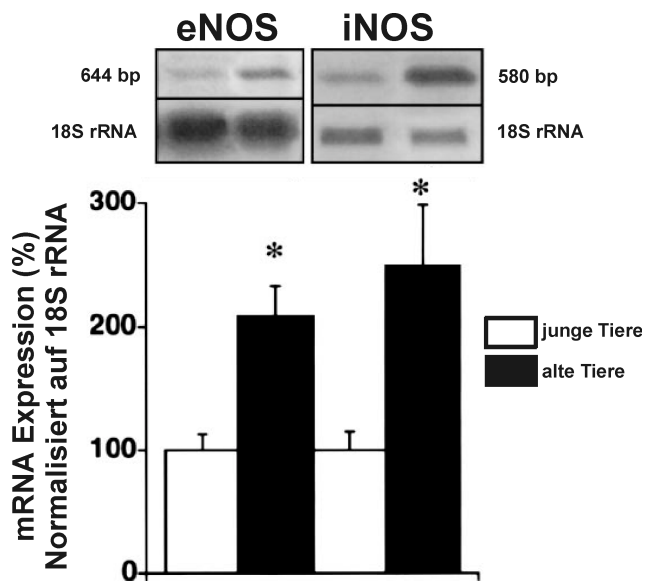


Abb. 3.4:
Vaskuläre eNOS (NOS3)- und iNOS (NOS2)-mRNA-Expression. Die mRNA-Expression wurde in der Aorta von jungen (n=6) und alten Ratten (n=8) bestimmt und auf die 18S rRNA-Expression normalisiert. (Daten als Prozent der Expression in jungen Tieren \pm SEM; * $p < 0,05$)

3.4.3 Erhöhte Expression von Endothelin-Rezeptor A und B in Erythropoietin-überexprimierenden Mäusen

Der Einfluss erhöhter Bioverfügbarkeit von NO in sauerstoffunabhängig Erythropoietin (EPO)-überexprimierenden transgenen Mäusen auf die Aktivität des Endothelin-Systems wurde untersucht. Das Endothelin-System der transgenen Tiere ist aktiviert. Wir konnten zeigen, dass die mRNA-Expression der Endothelin-Rezeptoren A und B in den transgenen Mäusen induziert ist. Die Induktion wird durch die Gabe eines spezifischen Endothelin-Rezeptor-A-Antagonisten (Darusentan, Knoll AG, Ludwigshafen) noch verstärkt (Abb. 3.5) (Quaschnig *et al.*, 2002)

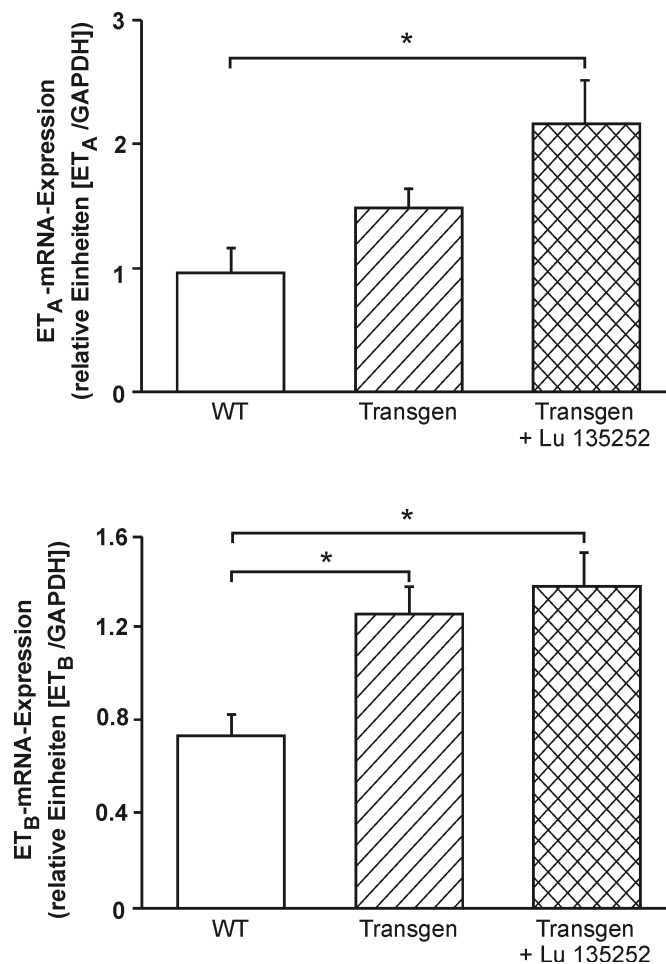


Abb. 3.5: Erhöhte vaskuläre ET-Rezeptor-mRNA-Expression in Mäusen mit exzessiver Erythrozytose. ET_A- und ET_B-Rezeptor-mRNA-Expression in der Aorta von Wildtyp (WT) und polyglobuläre transgenen Mäusen (Transgen) sowie transgenen Mäusen die einen ET_A-Rezeptor-Antagonisten (LU 13525) erhielten. Die mRNA-Expression wurde durch semiquantitative RT-PCR bestimmt und auf die Glycerin-Aldehyd-Dehydrogenase (GAPDH)-mRNA-Expression normalisiert. (n=5; * p < 0,05)

3.5 Untersuchungen zum Endothelin-System im humanen Myokard

In atrialem und ventrikulärem Myokard von Patienten mit Herzinsuffizienz und koronarer Herzkrankheit wurde die Expression des Endothelin-Systems (ppET-1, ECE-1, Endothelin-Rezeptoren A und B) analysiert, sowie der Endothelin-1-Peptidgehalt bestimmt. Dazu wurden die Patienten in drei Gruppen unterteilt (Spender, Empfänger ohne ACE-Inhibitor-Therapie, Empfänger mit ACE-Inhibitor-Therapie). Im Ventrikel von schwer herzinsuffizienten Patienten ist die Expression des Endothelin-Rezeptors A erhöht. Die Expression des Endothelin-Konvertierungs-Enzyms (ECE) ist im Ventrikel von Patienten mit Herzinsuffizienz erhöht. Diese erhöhte Expression wird durch die ACE-Inhibitor-Therapie teilweise normalisiert. Der Endothelin-1-Peptid-Gehalt im Myokard korreliert mit der Expression des Endothelin-Konvertierungs-Enzyms (Abb. 3.6) (Morawietz *et al.*, 2000a).

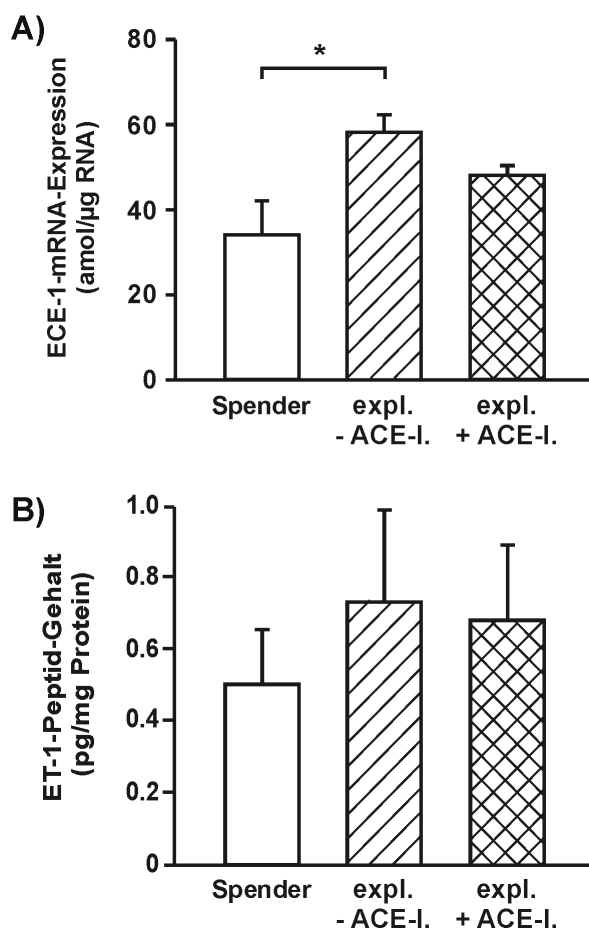


Abb. 3.6: ECE-1-mRNA-Expression und ET-1-Peptid-Gehalt im humanen ventrikulären Myokard. A ECE-1-mRNA-Expression im humanen Myokard von Spendern (n=7), Patienten mit Herzinsuffizienz ohne ACE-Inhibitor Therapie (expl - ACE-I, n=6) und Patienten mit ACE-Inhibitor-Therapie (expl + ACE-I, n=11) (amol/ μ g RNA \pm SEM; * p < 0,05) B ET-1-Peptidgehalt (pg/mg Protein)

Im rechten Atrium ist die ECE-1-mRNA-Expression vergleichbar zum Ventrikel erhöht (Morawietz *et al.*, 2002). Auch im atrialen Myokard wird die erhöhte ECE-1-Expression durch ACE-Inhibitor Therapie teilweise normalisiert (Abb. 3.7 A). Die Endothelin-1-Peptid-Bildung korreliert mit der Expression des Konvertierungs-Enzyms (Abb. 3.7 B). Im Gegensatz zum ventrikulären Gewebe wird im Atrium von Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz die Expression des Endothelin-Rezeptors B verringert (Morawietz *et al.*, 2002).

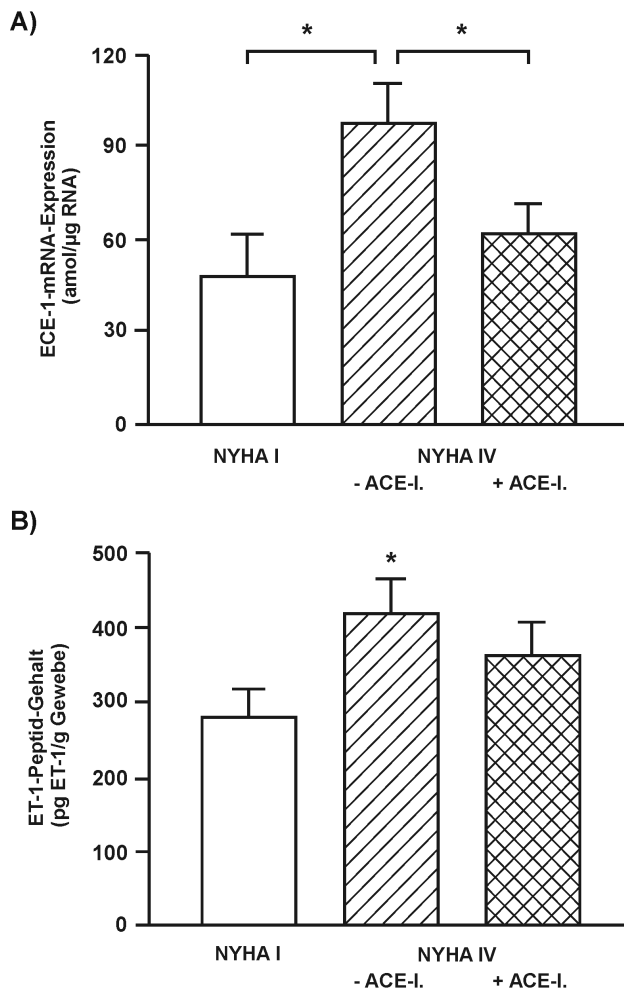


Abb. 3.7: ECE-1-mRNA-Expression und ET-1-Peptid-Gehalt im humanen Atrium. A ECE-1-mRNA-Expression im humanen Myokard von Patienten ohne Herzinsuffizienz (NYHA I, n=11), Patienten mit Herzinsuffizienz ohne ACE-Inhibitor Therapie (NYHA IV - ACE-I, n=25) und Patienten mit ACE-Inhibitor-Therapie (NYHA IV + ACE-I, n=15) (amol/μg RNA ± SEM; * p < 0,05) B ET-1-Peptidgehalt (pg/g Gewebe)

3.6 Expression der ECE-1-Isoformen in der *Arteria mammaria interna* von Patienten mit koronarer Herzkrankheit

In Zusammenarbeit mit der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie der MLU Halle-Wittenberg wurden arterielle Biopsien von Patienten mit koronarer Herzkrankheit untersucht, die sich einer elektiven Bypass-Operation unterzogen. 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 Expression der ECE-1-Isoformen durch *real time*-PCR (mit freundlicher Unterstützung von Dr. Andreas Schubert, Herzzentrum Leipzig) quantifiziert. Die medikamentöse Therapie und die klinischen Charakteristika der Patienten wurden retrospektiv erfasst.

Dabei wurde untersucht, ob die Reduzierung des Ang II-Spiegels durch medikamentöse ACE-Hemmer-Therapie, Blockade der Ang II-Wirkung durch Behandlung mit AT₁-Rezeptorantagonisten oder Behandlung mit Cholesterinsyntheseenzym-(CSE)-Hemmern die ECE-1-Isoform-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, 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 ECE-1-Isoform-mRNA-Expression. Medikamentöse Behandlung mit einem AT₁-Rezeptorantagonisten führte dagegen zu einer signifikanten Herabregulation der ECE-1-mRNA-Expression im Vergleich zu Patienten mit CSE-Hemmer-Therapie (Abb. 3.8). Diese Herabregulation der ECE-1-mRNA-Expression beruht hauptsächlich auf der signifikanten Reduktion der ECE-1a-mRNA-Expression in Patienten mit AT₁-Hemmer-Therapie im Vergleich zu Patienten mit CSE-Hemmer-Therapie. Darüber hinaus war die ECE-1a-mRNA in Patienten mit AT₁-Blockade niedriger exprimiert als in Patienten mit ACE-Hemmer-Therapie. Zusätzlich ist auch die ECE-1b-mRNA-Expression durch AT₁-Antagonisten im Vergleich zur CSE-Hemmung herabreguliert.

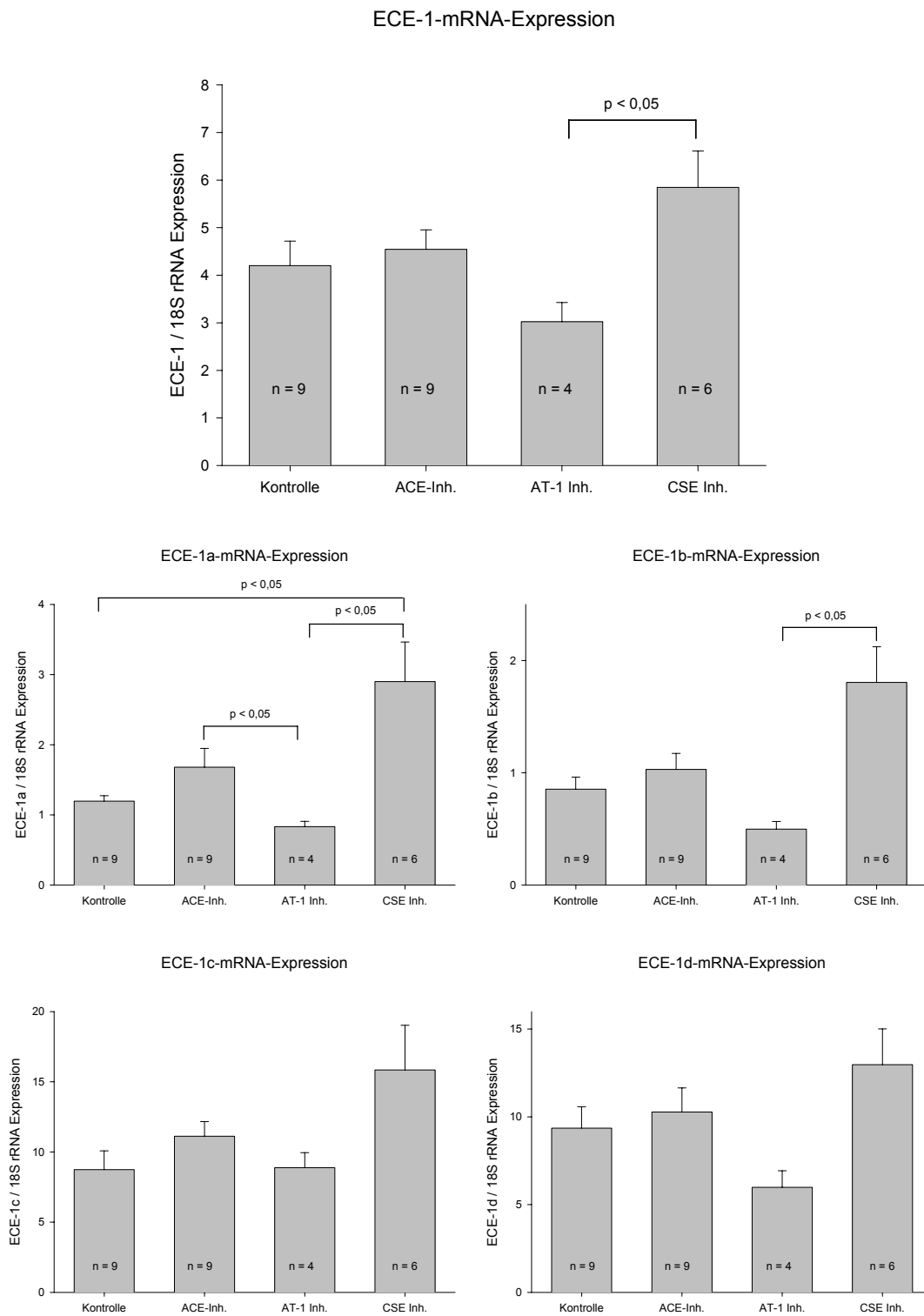


Abb. 3.8: Regulation der ECE-1-mRNA-Expression durch medikamentöse Therapie in arteriellen Biopsien von Patienten mit koronarer Herzkrankheit. Die Biopsien der *Arteria mammaria interna* wurden nach vorheriger Information und Zustimmung aus Patienten mit koronarer Herzkrankheit präpariert, die sich einer elektiven Bypass-Operation unterzogen. In der daraus isolierten RNA wurde die mRNA-Expression der ECE-1-Isoformen durch *real time*-PCR quantifiziert und auf die Expression der 18S rRNA normalisiert. (ACE-Inh. – ACE-Inhibitor-Therapie, AT-1 Inh. – AT₁-Inhibitor-Therapie, CSE Inh.–. CSE-Inhibitor-Therapie)

3.7 Expression des Ephrin/Eph-Systems in unterschiedlichen Endothelzellen und glatten Muskelzellen

Im zweiten Teil der vorliegenden Dissertation wurde die Expression von Mediatoren der vaskulären Entwicklung und Differenzierung untersucht. Schwerpunkt bildeten dabei das Ephrin/Eph- und das Angiopoietin/Tie-System.

Zunächst wurde die absolute Expression von EphB4 und Ephrin-B2 in unterschiedlichen Zelltypen verglichen. Dazu wurden PCR-Fragmente von EphB4 und Ephrin-B2 in den pCR[®] II-TOPO[®]-Vektor (Invitrogen) kloniert und in *E.coli* transformiert. Die Identität der isolierten Plasmide wurde durch Sequenzierung bestätigt. Zur Generierung von Standards für die mRNA-Quantifizierung wurden nach Restriktionsverdau (*EcoR* I) die klonierten Fragmente durch Gelelektrophorese und Elution isoliert. Die Konzentration der Standard-Fragmente wurde photometrisch bestimmt. Verdünnungsreihen der EphB4- und Ephrin-B2-Standard-Fragmente wurden in *real time*-PCR-Analysen (rotorgene, Corbett Research) eingesetzt. In diesen Untersuchungen wurde die Expression von EphB4 und Ephrin-B2 in humanen Endothelzellen aus Nabelschnurvene (HUVEC), Nabelschnurarterie (HUAEC) und Koronararterien (HCAEC) sowie humanen glatten Muskelzellen (HSMC, freundlicherweise von Frau Dr. Hipper, Julius-Bernstein-Institut für Physiologie, zur Verfügung gestellt) quantifiziert (Tabelle 3.2).

Tab. 3.2: Quantifizierung der mRNA-Expression von EphB4 und Ephrin-B2 in humanen Endothelzellen aus Nabelschnurvene (HUVEC), Nabelschnurarterie (HUAEC) und Koronararterie (HCAEC) sowie glatten Muskelzellen (HSMC)

	HUVEC	HUAEC	HCAEC	HSMC
EphB4 [amol/ μ g RNA]	0,002	0,002	0,005	0,001
Ephrin-B2 [amol/ μ g RNA]	4,9	8,5	4,1	0,1

3.8 Nachweis der Ephrin-B2-Expression in adulten humanen Geweben durch *in situ*-Hybridisierung

Die Expression von Ephrin-B2 wurde bisher vorrangig in entwicklungspezifischem Zusammenhang und in unterschiedlichen Modellen der Embryonalentwicklung untersucht. Daher wurde durch *in situ*-Hybridisierung die Expression von Ephrin-B2 in adulten Gewebe analysiert. Paraffinschnitte von Umbilikalvenen, Umbilikalarterien, Aorta, linken und rechtem Ventrikel wurden mit humanen Ephrin-B2-Sonden, die freundlicherweise von Gudrun Dandekar von Tumorbiologiezentrum Freiburg zur Verfügung gestellt wurden, hybridisiert. In allen untersuchten Geweben war eine Expression von Ephrin-B2 in endothelialen Gefäßbereichen nachweisbar (Abb. 3.9).

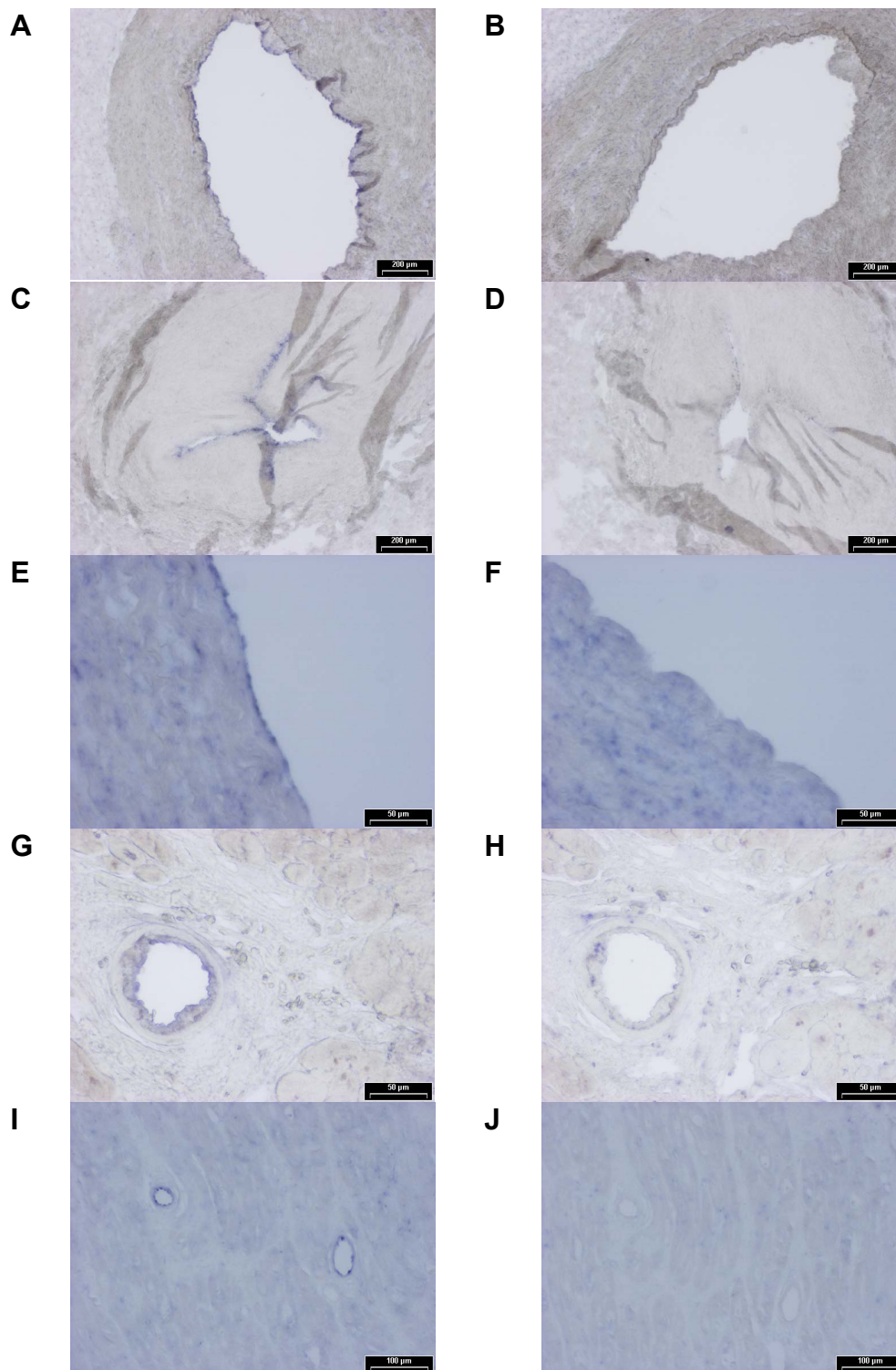


Abb. 3.9: *In situ*-Hybridisierung zum Nachweis der Ephrin-B2-Expression in unterschiedlichen humanen Geweben. Paraffinschnitte (6 µm) wurden mit einer humanen Ephrin-B2 antisense- (A, C, E, G, I) bzw. sense- (B, D, F, H, J) Sonde hybridisiert. A und B Umbilikalvene, C und D Umbilikalarterie, E und F Aorta, G und H linker Ventrikel, I und J rechter Ventrikel. In allen untersuchten Geweben konnte eine Ephrin-B2-Expression in endothelialen Gefäßbereichen nachgewiesen werden.

3.9 Adhäsion und Wachstum von Endothelzellen auf EphB4-Fc bzw. Ephrin-B2-Fc-beschichteten Zellkulturschalen

Sowohl die Ephrin-Liganden als auch die Eph-Rezeptoren sind als repulsive Faktoren für die Differenzierung von Nervenzellen beschrieben worden. Durch die Beschichtung von Bereichen von Zellkulturschalen mit mEphB4-Fc-Chimären (R&D-Systems) bzw. mEphrin-B2-Fc-Chimären (R&D-Systems) sollte ihr Einfluss auf die Anheftung und das Wachstum von Endothelzellen analysiert werden. Dazu wurden Gelatine beschichtete Zellkulturschalen mit Fc-Chimären in unterschiedlichen Verdünnungen inkubiert, mit PBS gewaschen und anschließend die Endothelzellen plattiert. Die Anzahl der angehefteten Zellen wurde in definierten beschichteten bzw. unbeschichteten Arealen nach 24 Stunden ausgezählt. Sowohl mEphrin-B2-Fc, als auch mEphB4-Fc verhinderten konzentrationsabhängig die Anheftung von HUVEC. Bei einer Konzentration von 100 ng/μl konnten sich nur noch einzelne Zellen anheften (Abb. 3.10).

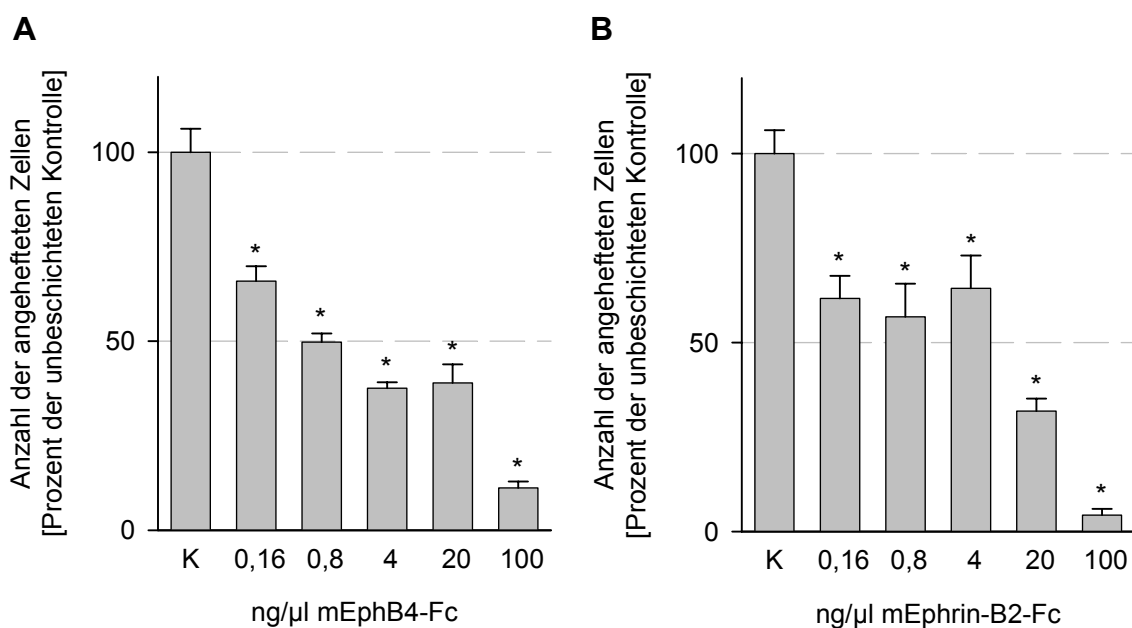


Abb. 3.10: Anheftung von HUVEC auf (primär Gelatine beschichteten) Zellkulturschalen mit zusätzlicher Beschichtung von Bereichen mit Rezeptor-Chimären von mEphB4-Fc bzw. Ligand-Chimären von mEphrin-B2-Fc unterschiedlicher Verdünnung (0,16 - 100 ng/μl in 0,1% BSA/PBS, K = Kontrolle 0,1% BSA/PBS). A Beschichtung mit mEphB4-Fc, B Beschichtung mit mEphrin-B2-Fc. (n ≥ 4; * = p ≤ 0,05 vs. Kontrolle)

Die angehefteten Zellen wurden anschließend weitere 5 Tage kultiviert. Diesen Zellen war auch in Ihrem Wachstum eingeschränkt. Bei einer Konzentration von 100 ng/μl zeigte sich eine scharfe Abgrenzung zu den beschichteten Bereichen, auf denen keine Migration oder Wachstum nachweisbar waren (Abb. 3.11).

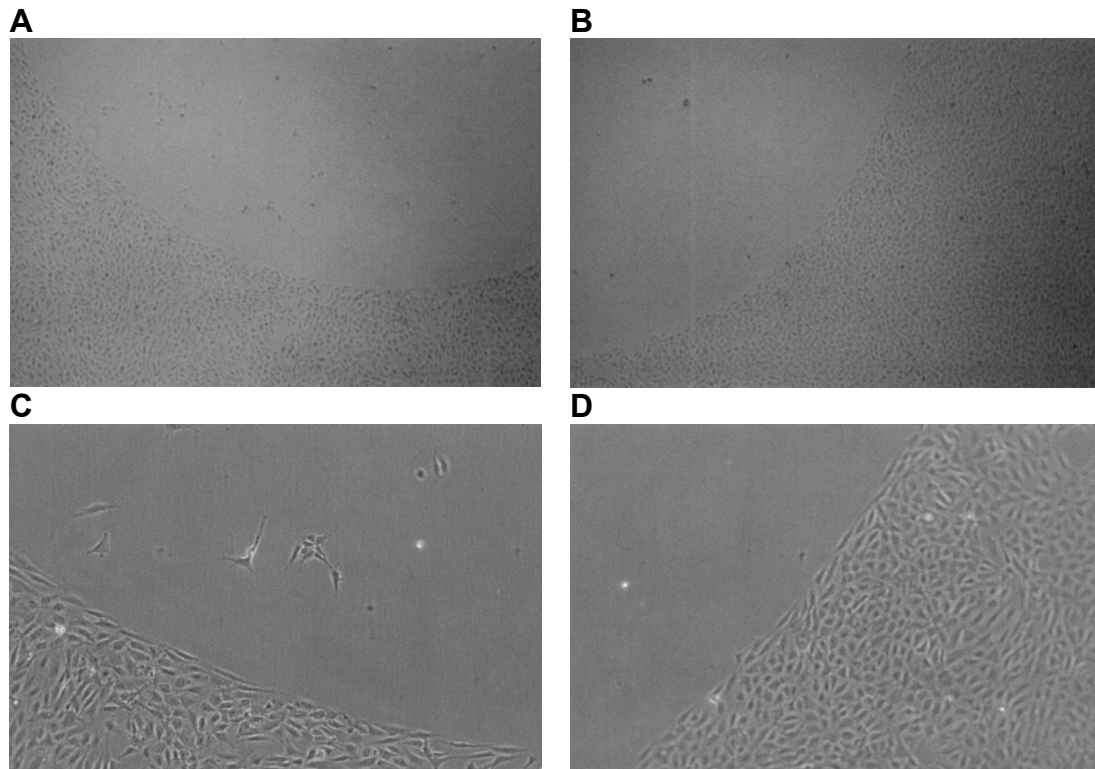


Abb. 3.11: Wachstum von HUVEC auf (primär Gelatine-beschichteten) Zellkulturschalen mit zusätzlicher Beschichtung von Bereichen mit Rezeptor-Chimären von mEphB4-Fc bzw. Ligand-Chimären von mEphrin-B2-Fc je (100 ng/ μ l in 0,1% BSA/PBS). Nach 6 Tagen Kultivierung waren die unbeschichteten Bereiche konfluent. In den beschichteten Bereichen erfolgte kein Wachstum. A Beschichtung mit mEphB4-Fc 20fache Vergrößerung, B Beschichtung mit mEphrin-B2-Fc 20fache Vergrößerung, C Beschichtung mit mEphB4-Fc 50fache Vergrößerung, D Beschichtung mit mEphrin-B2-Fc 50fache Vergrößerung.

3.10 Regulation des Ephrin/Eph-Systems durch Schubspannung in Endothelzellen (HUVEC)

Die Regulation der Expression von Genen des Ephrin/Eph-Systems (Ephrin-B2/EphB4) durch laminare Schubspannung wurde in humanen Endothelzellen (HUVEC) untersucht. Dazu wurden die Endothelzellen für unterschiedliche Zeiten mit Schubspannung unterschiedlicher Dosis behandelt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und die Gesamt-RNA präpariert. Die Expression wurde mittels RT-PCR analysiert. Für jeden Zeitpunkt und für jede Dosis wurden parallel Zellen der gleichen Primärzellpräparation als Kontrolle ohne Schubspannung inkubiert. Die Expression der untersuchten Gene wurde auf die Expression der 18S rRNA normiert und als Prozent der jeweiligen Kontrolle angegeben.

3.10.1 Zeit- und Dosisabhängigkeit der Ephrin-B2- / EphB4-Expression

Die Applikation von Schubspannung (30 dyn/cm²) für unterschiedliche Zeiten (1, 4, 12, 24 Stunden) führte in HUVEC zu einer transienten Induktion der EphB4-mRNA nach 4 Stunden auf das 2,3-fache. Nach chronischer Applikation arterieller Schubspannung (24 h) erreichte die Expression wieder das Kontrollniveau. Eine Applikation von Schubspannung unterschiedlicher Dosis (1 - 50 dyn/cm²) für die Dauer von 24 Stunden führte zu einer 1,5-fachen Induktion der EphB4-mRNA bei 10 dyn/cm². Bei allen anderen Dosen zeigte sich ein Trend zur Erhöhung der Expression, ohne Signifikanzniveau zu erreichen (Abb. 3.11 A und B).

Die Applikation von Schubspannung führte zu einer zeit- und dosisabhängigen Herabregulation der Ephrin-B2-mRNA. Durch arterielle Schubspannung von 30 dyn/cm² für 24 Stunden wurde die Expression auf die Hälfte des Kontrollniveaus verringert. Diese Herabregulation konnte auch durch eine weitere Steigerung der Schubspannung nicht verstärkt werden (Abb. 3.11 C und D). Diese Herabregulation der Ephrin-B2-mRNA Expression wurde mittels quantitativer *real time*-PCR mit externem Standard in ausgewählten Proben bestätigt.

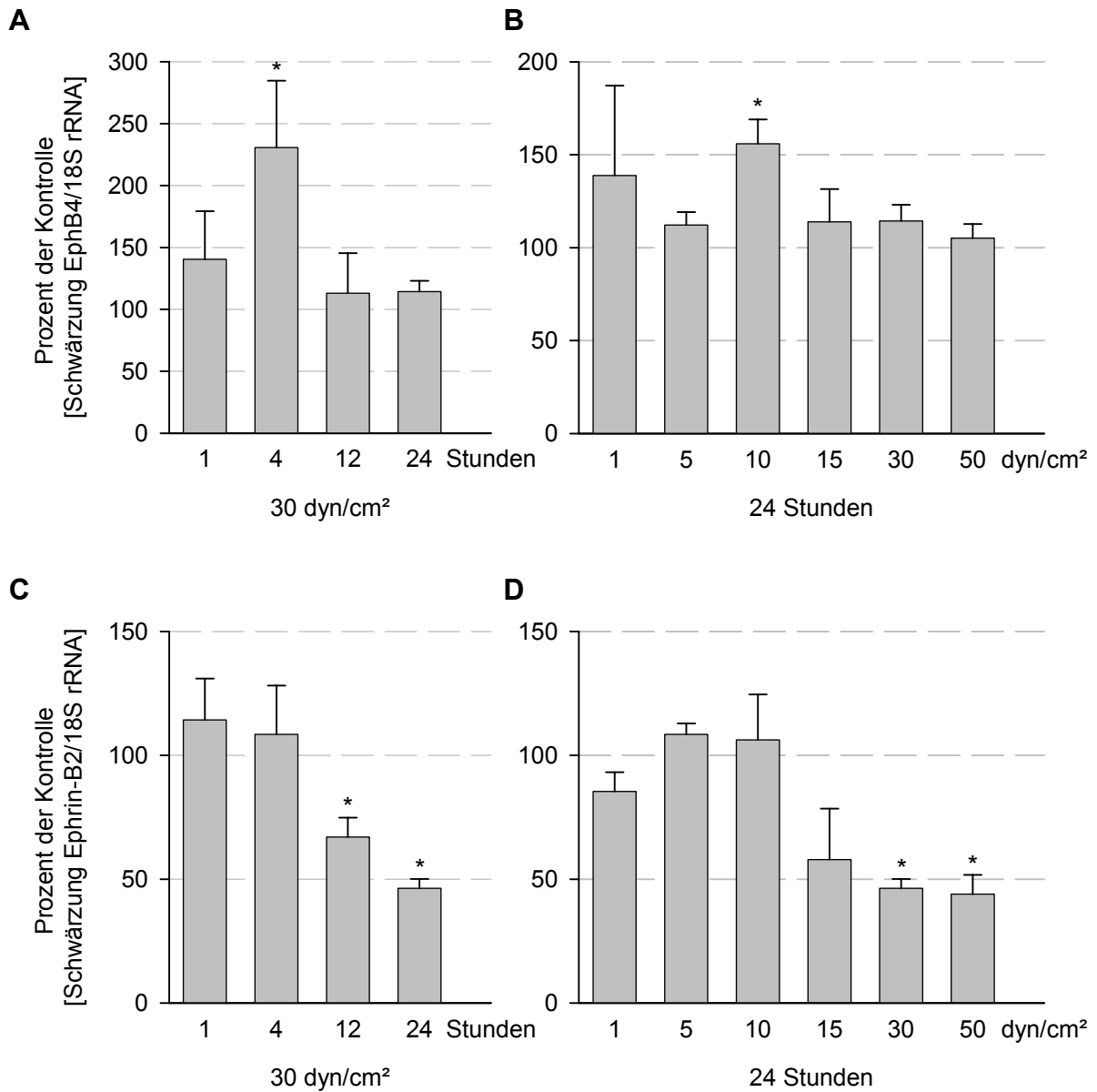


Abb. 3.11: Zeit- und Dosisabhängigkeit der mRNA-Expression von EphB4 und Ephrin-B2 nach Applikation von Schubspannung. A EphB4, Zeitabhängigkeit bei Schubspannung von 30 dyn/cm², B EphB4, Dosisabhängigkeit bei Schubspannung für 24 Stunden, C Ephrin-B2, Zeitabhängigkeit bei Schubspannung von 30 dyn/cm², D Ephrin-B2, Dosisabhängigkeit bei Schubspannung für 24 Stunden. Angabe der Expression als Prozent der stationären Kontrolle. (n ≥ 5; * = p ≤ 0,05 vs. stationäre Kontrolle)

3.10.2 Ephrin-B2- / EphB4-Expression in HUVEC nach Schubspannung auf unterschiedlichen extrazellulären Matrices

HUVEC's wurden auf Gelatine-, Kollagen- bzw. Laminin-beschichteten Zellkulturschalen kultiviert und anschließend Schubspannung (1 und 30 dyn/cm² für 24h) ausgesetzt. Von den Proben wurde die Gesamt-RNA präpariert und mittels RT-PCR analysiert. Die EphB4-mRNA-Expression wurde durch unterschiedliche Schubspannungen auf keiner der Matrices signifikant reguliert (Abb. 3.12 A). Die Ephrin-B2-mRNA-Expression wurde durch arterielle Schubspannung auf Gelatine-beschichteten Zellkulturschalen auf die Hälfte reduziert. Diese Herabregulation wurde auf Kollagen sowie auf Laminin nicht beobachtet (Abb. 3.12 B).

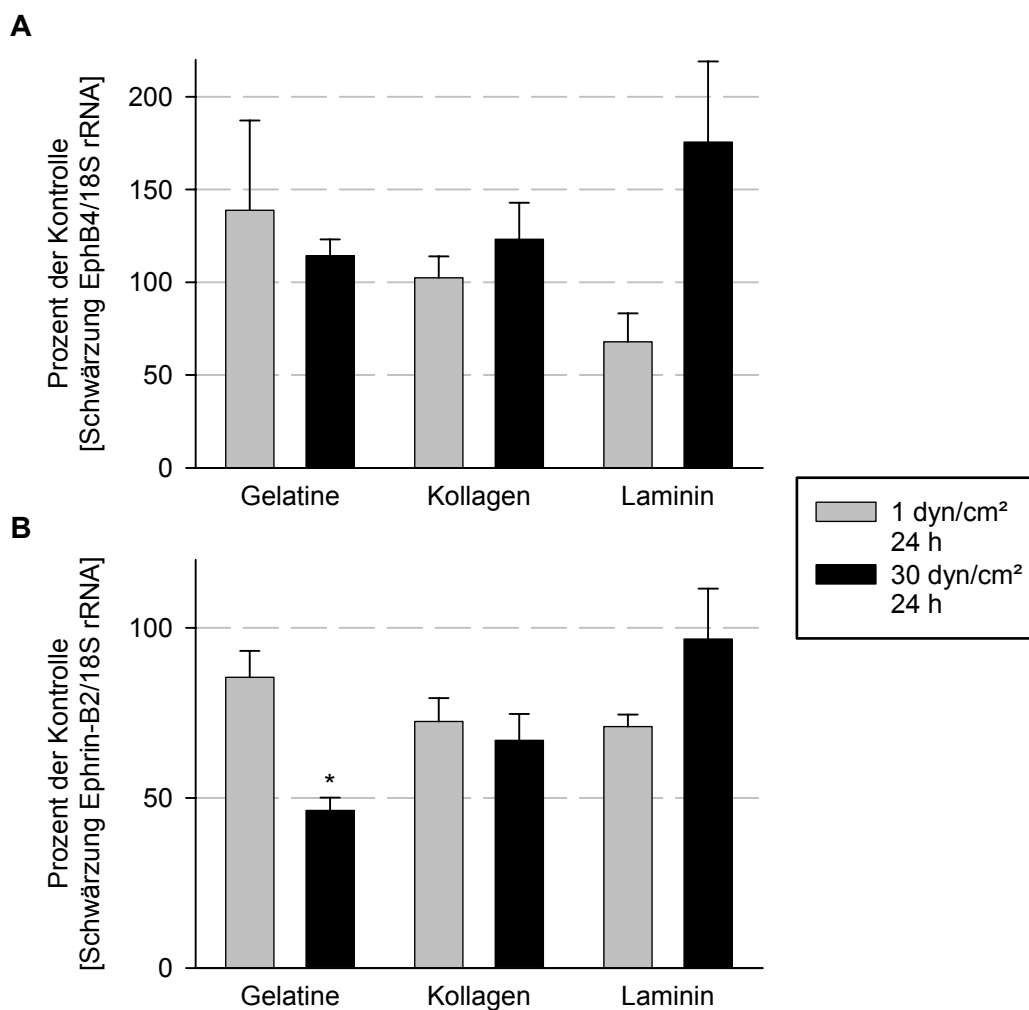


Abb. 3.12: Schubspannungsabhängige Expression von EphB4 und Ephrin-B2 in HUVEC nach Wachstum auf unterschiedlichen extrazellulären Matrices. HUVEC's wurden auf Gelatine-, Kollagen- bzw. Laminin-beschichteten Zellkulturschalen kultiviert und anschließend Schubspannung (1 und 30 dyn/cm² für 24h) ausgesetzt. A EphB4-, B Ephrin-B2-mRNA-Expression, Angabe der Expression als Prozent der stationären Kontrolle. (n ≥ 5; * = p ≤ 0,05 vs. stationäre Kontrolle)

3.10.3 Einfluss von Proteinkinaseinhibitoren auf die Regulation der Ephrin-B2- / EphB4-Expression in HUVEC nach Schubspannung

HUVEC's wurden auf Gelatine beschichteten Zellkulturschalen kultiviert und anschließend Schubspannung (1 und 30 dyn/cm² für 24h) ausgesetzt. Zur Aufklärung der möglicherweise involvierten Signalwege wurden die Zellen jeweils eine Stunde vor Beginn der Schubspannungsexperimente mit Inhibitoren der Proteinkinase C (RO-31-8220) bzw. Tyrosinkinase (Herbimycin A) inkubiert. Nach der Applikation wurde die Gesamt-RNA präpariert und mittels RT-PCR analysiert. Für die EphB4-mRNA-Expression wurde keine Regulation gefunden. Die Herabregulation der Ephrin-B2-mRNA-Expression durch arterielle Schubspannung wurde durch die Hemmung der Proteinkinase C verhindert. Die Hemmung der Tyrosinkinase verhinderte ebenfalls die signifikante Herabregulation der Ephrin-B2-Expression, ohne das Kontrollniveau vollständig zu erreichen (Abb. 3.13).

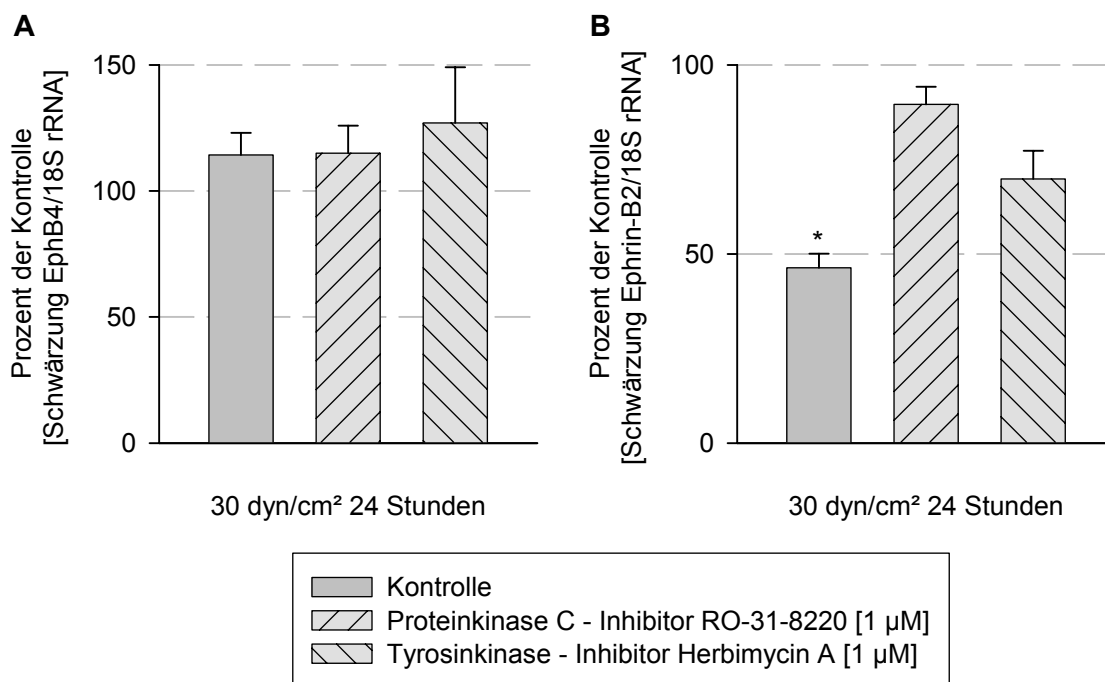


Abb. 3.13: Einfluss von Proteinkinaseinhibitoren auf die mRNA-Expression von EphB4 und Ephrin-B2 nach Applikation von Schubspannung. A EphB4-mRNA-Expression bzw. B Ephrin-B2-mRNA-Expression nach Inhibition der Proteinkinase C durch RO-31-8220 [1µM] bzw. Tyrosinkinase durch Herbimycin A [1µM] nach Applikation von Schubspannung (30 dyn/cm² für 24 Stunden). Angabe der Expression als Prozent der stationären Kontrolle (n ≥ 5; * = p ≤ 0,05 vs. stationäre Kontrolle).

3.10.4 Regulation des Ephrin/Eph-Systems durch Schubspannung in Endothelzellen unterschiedlicher GefäÙe (HUVEC, HUAEC, HCAEC)

Die Regulation der Expression von Genen des Ephrin/Eph-Systems durch laminare Schubspannung wurde in humanen Endothelzellen unterschiedlicher GefäÙe untersucht. Dazu wurden Primärkulturen von Endothelzellen aus der Nabelschnurarterie (HUAEC) und -vene (HUVEC), sowie Endothelzellen aus der Koronararterie (HCAEC, 5. Passage, Clonetics) kultiviert und chronische (24 Stunden) venöse (1 dyn/cm²) bzw. arterielle (30 dyn/cm²) laminare Schubspannung appliziert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und die Gesamt-RNA präpariert. Die Expression der untersuchten Gene wurde mittels RT-PCR analysiert. In jedem Experiment wurden parallel analog kultivierte Zellen als Kontrolle ohne Schubspannung inkubiert. Die Expression der untersuchten Gene wurde auf die Expression der 18S rRNA normalisiert und als Prozent der jeweiligen Kontrolle angegeben.

Die Expression der EphB4-mRNA wurde in keinem der Zelltypen durch Schubspannung reguliert (Abb. 3.14 A).

Die Expression der Ephrin-B2-mRNA wurde in HUVEC durch arterielle laminare Schubspannung auf die Hälfte der Kontrolle herabreguliert. In HCAEC verringerte die arterielle Schubspannung die Expression um ein Drittel. HUAEC zeigten dagegen keine Regulation der Ephrin-B2-mRNA-Expression durch Schubspannung (Abb. 3.14 B).

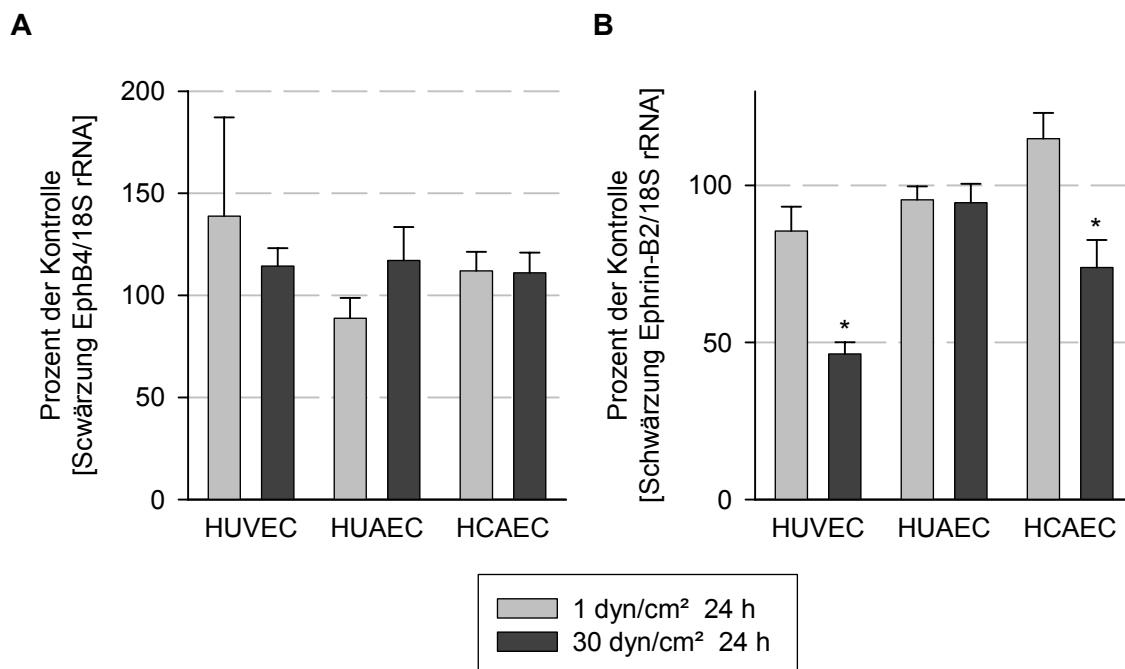


Abb. 3.14: Abhängigkeit der mRNA-Expression von EphB4 und Ephrin-B2 nach Applikation von Schubspannung vom GefäÙtyp (HUVEC, HUAEC, HCAEC). A EphB4, B Ephrin-B2. Angabe der Expression als Prozent der stationären Kontrolle. (n ≥ 5; * = p ≤ 0,05 vs. stationäre Kontrolle)

3.11 Regulation des Angiopoietin/Tie-Systems durch Schubspannung in Endothelzellen (HUVEC)

Die Regulation der Expression von Genen des Angiopoietin/Tie-Systems (Angiopoietin-2/Tie2) durch laminare Schubspannung wurde in humanen Endothelzellen untersucht. Dazu wurde den Endothelzellen (HUVEC) für unterschiedliche Zeiten Schubspannung unterschiedlicher Dosis ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und die Gesamt-RNA präpariert. Die Expression wurde mittels RT-PCR analysiert. Für jeden Zeitpunkt und Dosis wurden parallel Zellen der gleichen Präparation als Kontrollen ohne Schubspannung inkubiert. Die Expression der untersuchten Gene wurde auf die Expression der 18s rRNA normiert und als Prozent der jeweiligen Kontrolle angegeben.

3.11.1 Zeit- und Dosisabhängigkeit der Angiopoietin-2- / Tie2-Expression

Eine Schubspannung von 30 dyn/cm² für unterschiedliche Zeiten (1, 4, 12, 24 Stunden) reguliert die Tie2-mRNA in HUVEC nicht. Auch eine Applikation von Schubspannung unterschiedlicher Dosis (1 – 50 dyn/cm²) für die Dauer von 24 Stunden führte zu keiner Regulation der Tie-mRNA-Expression (Abb. 3.15 A und B).

Die Applikation von Schubspannung führte jedoch zu einer zeit- und dosisabhängigen Regulation der Angiopoietin-2-mRNA. Durch arterielle Schubspannung von 30 dyn/cm² für 12 Stunden wurde die Expression auf ein Viertel der Kontrolle verringert, nach 24 Stunden war die Expression immer noch auf 57% des Kontrollniveaus herabreguliert. (Abb. 3.15 C). Venöse laminare Schubspannung (1 dyn/cm²) von 24 Stunden führte dagegen zu einer Induktion der Angiopoietin-2-mRNA-Expression (Abb. 3.15 D).

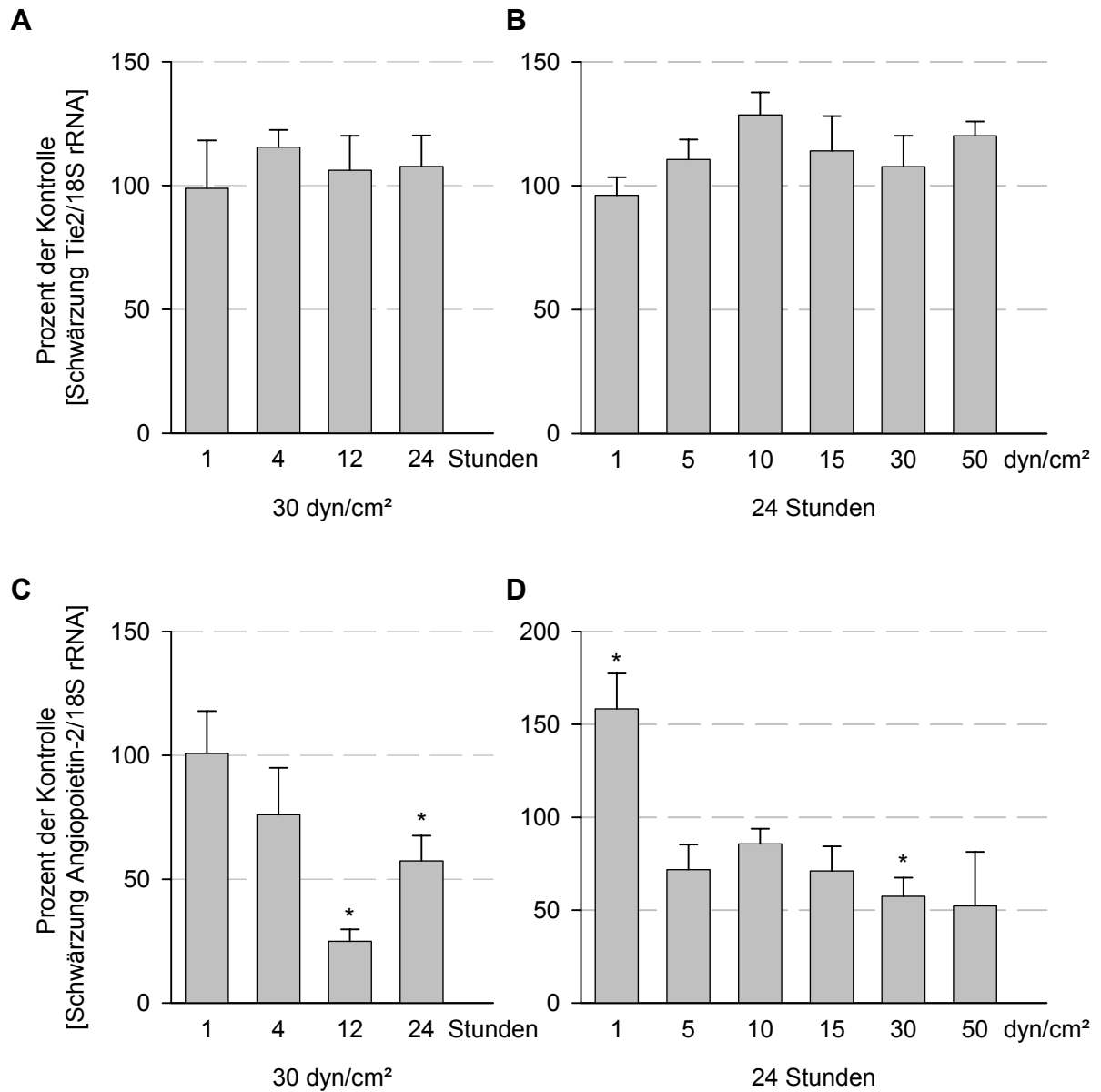


Abb. 3.15: Zeit- und Dosisabhängigkeit der mRNA-Expression von Tie2 und Angiopoietin-2 nach Applikation von Schubspannung. A Tie2, Zeitabhängigkeit bei Schubspannung von 30 dyn/cm², B Tie2 Dosisabhängigkeit bei Schubspannung für 24 Stunden, C Angiopoietin-2, Zeitabhängigkeit bei Schubspannung von 30 dyn/cm², D Angiopoietin-2 Dosisabhängigkeit bei Schubspannung für 24 Stunden. Angabe der Expression als Prozent der stationären Kontrolle (n ≥ 5; * = p ≤ 0,05 vs. stationäre Kontrolle).

3.11.2 Angiopoietin-2-Proteinexpression in HUVEC nach Schubspannung

HUVEC's wurden wie unter 3.2.1 beschrieben kultiviert und venöse (1 dyn/cm²) sowie arterielle (30 dyn/cm²) Schubspannung für 24 Stunden appliziert. Die Zellen wurden anschließend gewaschen und das Gesamtprotein präpariert. Im Western-Blot wurde das Angiopoietin-2-Protein mit einem polyklonalen Rabbit-anti-Angiopoietin-2-Antikörper (Zymed Laboratories) nachgewiesen. Chronische venöse laminare Schubspannung induzierte das Angiopoietin-2-Protein, arterielle laminare Schubspannung verringerte dagegen die Expression (Abb. 3.16). In einem weiteren Versuch wurden HUVEC's für 80 Stunden laminarer Schubspannung ausgesetzt und anschließend die Angiopoietin-2-Proteinexpression bestimmt. Auch nach mehr als 3 Tagen war Angiopoietin-2 durch venöse Schubspannung weiterhin erhöht (163% vs. Kontrolle, n = 2) und durch arterielle Schubspannung erniedrigt exprimiert (20% vs. Kontrolle, n = 2).

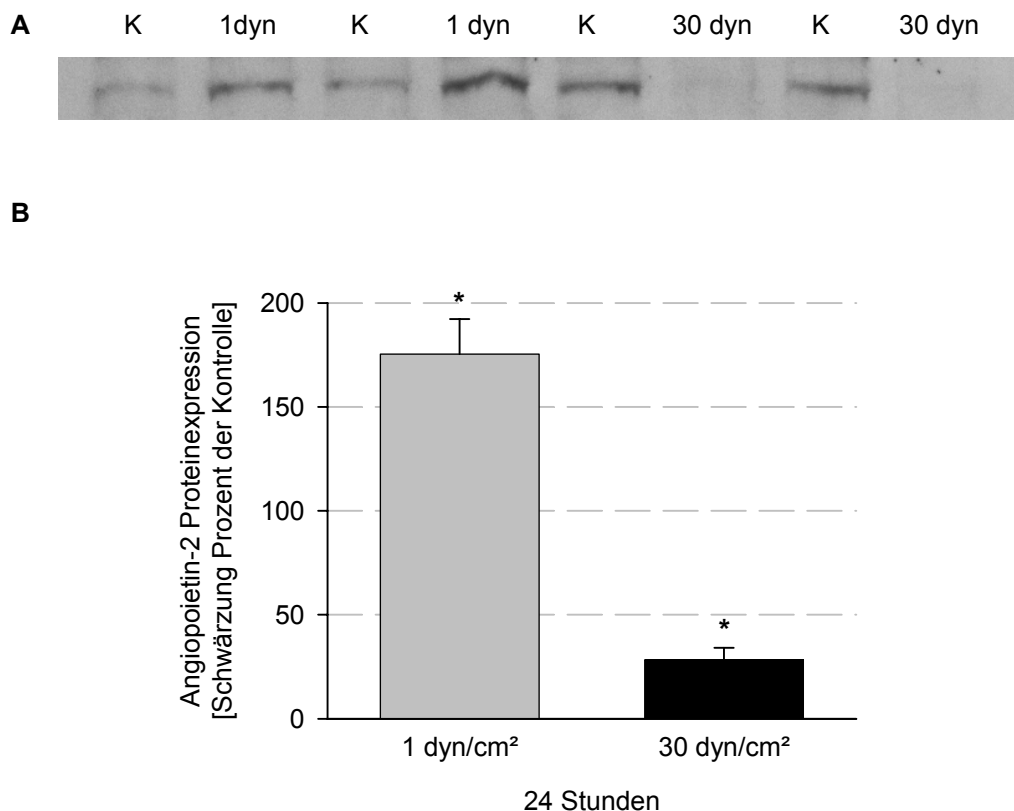


Abb. 3.16: Angiopoietin-2-Proteinexpression in HUVEC nach Applikation von Schubspannung. A repräsentativer Angiopoietin-2-Westernblot (K – stationäre Kontrolle der gleichen Primärzellkulturpräparation, 1 dyn – Schubspannung von 1 dyn/cm² für 24 Stunden, 30 dyn – Schubspannung von 30 dyn/cm² für 24 Stunden) B Statistische Auswertung von Angiopoietin-2-Westernblots. Angabe der Expression als Prozent der stationären Kontrolle. (n = 6; * = p ≤ 0,05 vs. stationäre Kontrolle)

3.11.3 Angiopoietin-2- / Tie2-Expression in HUVEC nach Schubspannung auf unterschiedlichen extrazellulären Matrices

HUVEC's wurden auf Gelatine-, Kollagen- bzw. Laminin-beschichteten Zellkulturschalen kultiviert und anschließend Schubspannung (1 und 30 dyn/cm² für 24h) ausgesetzt. Anschließend wurde die Gesamt-RNA präpariert und die Tie2- und Angiopoietin-2-mRNA-Expression durch RT-PCR analysiert. Die Tie2-mRNA-Expression wurde durch unterschiedlichen Schubspannungen auf keiner der Matrices signifikant reguliert (Abb. 3.17 A), zeigte jedoch einen Trend zu erhöhter Expression durch arterielle laminare Schubspannung (30 dyn/cm²) auf Kollagen und Laminin. Die Angiopoietin-2-mRNA-Expression wurde auf Gelatine-beschichteten Zellkulturschalen durch venöse Schubspannung signifikant induziert, durch arterielle Schubspannung reduziert. Die Induktion durch venöse Schubspannung war in Zellen auf Kollagen und Laminin als Trend zu erkennen, ohne Signifikanz zu erreichen. Die Herabregulation durch arterielle Schubspannung erfolgte in Zellen auf Kollagen und Laminin im vergleichbaren Umfang wie auf Gelatine (Abb. 3.17 B).

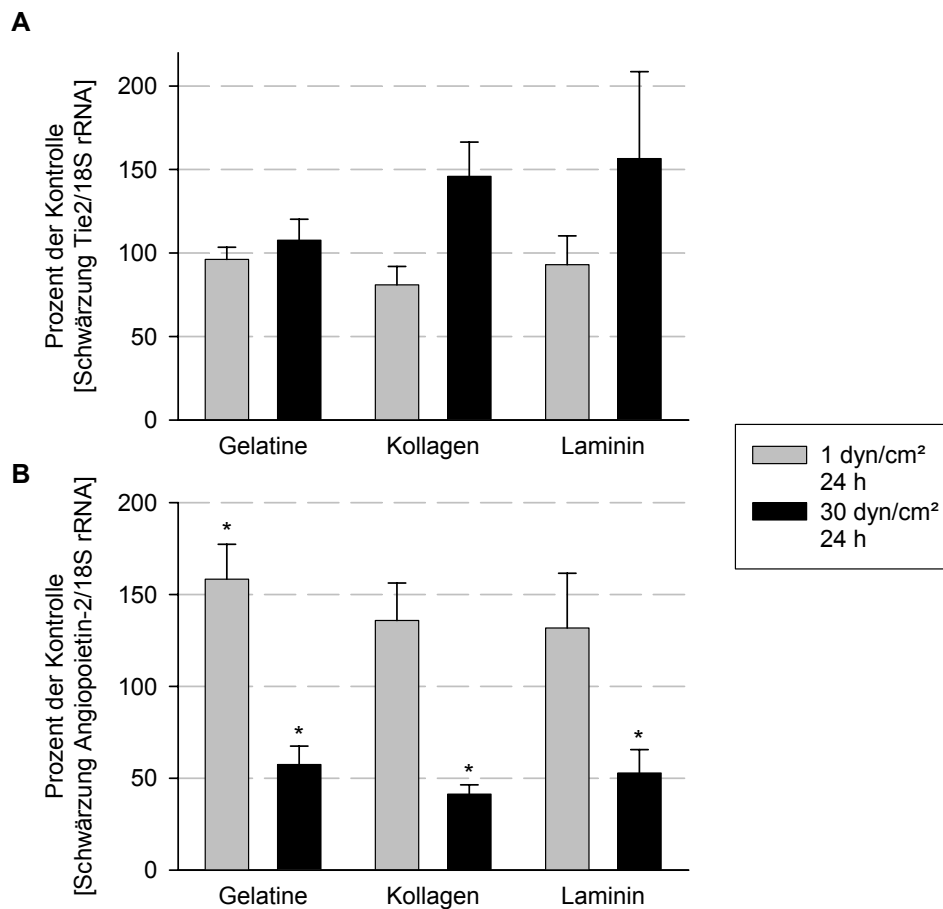


Abb. 3.17: Schubspannungsabhängige mRNA-Expression von Tie2 und Angiopoietin-2 in HUVEC nach Wachstum auf unterschiedlichen extrazellulären Matrices. HUVEC's wurden auf Gelatine-, Kollagen- bzw. Laminin-beschichteten Zellkulturschalen kultiviert und anschließend Schubspannung (1 und 30 dyn/cm² für 24h) ausgesetzt. A Tie2, B Angiopoietin-2. Angabe der mRNA-Expression als Prozent der stationären Kontrolle (n ≥ 5; * = p ≤ 0,05 vs. stationäre Kontrolle).

3.11.4 Einfluss von Proteinkinaseinhibitoren auf die Regulation der Angiotensin-2- / Tie2-Expression in HUVEC nach Schubspannung

HUVEC's wurden auf Gelatine-beschichteten Zellkulturschalen kultiviert und anschließend Schubspannung (1 und 30 dyn/cm² für 24 h) ausgesetzt. Zur Aufklärung der involvierten Signalwege wurden die Zellen jeweils ein Stunde vor Beginn der Schubspannungsexperimente mit Inhibitoren der Proteinkinase C (RO-31-8220) oder Tyrosinkinasen (Herbimycin A) inkubiert. Nach dem Experiment wurde die Gesamt-RNA präpariert und die mRNA-Expression durch RT-PCR analysiert. Für die Tie2-mRNA-Expression konnte keine Regulation nachgewiesen werden (Abb. 3.18 A). Die Herabregulation der Angiotensin-2-mRNA-Expression wurde durch Hemmung der Proteinkinase C verhindert. Eine Hemmung von Tyrosinkinasen hatte dagegen keinen Einfluss auf die verringerte Expression der Angiotensin-2-mRNA (Abb. 3.18 B).

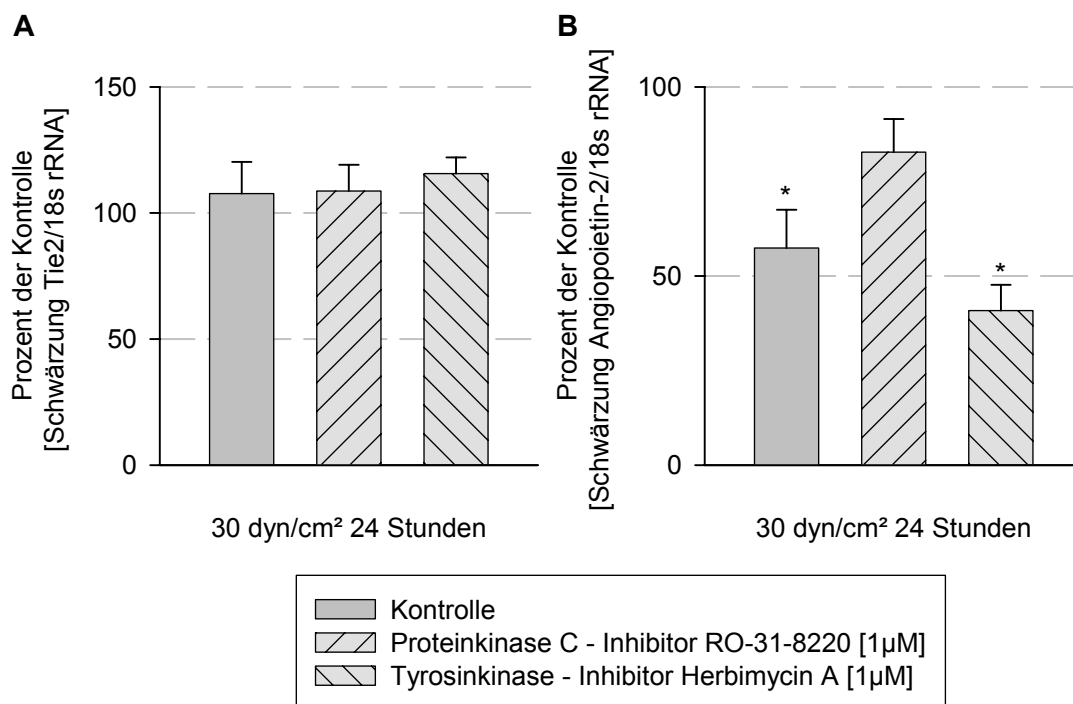


Abb. 3.18: Einfluss von Proteinkinaseinhibitoren auf die mRNA-Expression von Tie2 und Angiotensin-2 nach Applikation von Schubspannung. A Tie2-mRNA-Expression bzw. B Angiotensin-2-mRNA-Expression nach Inhibition der Proteinkinase C durch RO-31-8220 [1μM] bzw. Tyrosinkinasen durch Herbimycin A [1μM] und Applikation von Schubspannung (30 dyn/cm² für 24 Stunden). Angabe der Expression als Prozent der stationären Kontrolle (n ≥ 5; * = p ≤ 0,05 vs. stationäre Kontrolle).

3.11.5 Regulation des Angiopoietin/Tie-Systems durch Schubspannung in Endothelzellen unterschiedlicher Gefäße (HUVEC, HUAEC, HCAEC)

Die Regulation der Expression von Genen des Angiopoietin/Tie-Systems durch laminare Schubspannung wurde in humanen Endothelzellen unterschiedlicher Gefäße untersucht. Dazu wurden Primärkulturen von Endothelzellen aus der Nabelschnurarterie (HUAEC) und -vene (HUVEC), sowie Endothelzellen aus der Koronararterie (HCAEC, 5. Passage, Clonetics) kultiviert und chronische (24 Stunden) venöse (1 dyn/cm²) bzw. arterielle (30 dyn/cm²) laminare Schubspannung ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und die Gesamt-RNA präpariert. Die Expression der untersuchten Gene wurde mittels RT-PCR analysiert. Für jedes Experiment wurden parallel kultivierte Zellen als Kontrollen ohne Schubspannung inkubiert. Die Expression der untersuchten Gene wurde auf die Expression der 18S rRNA normalisiert und als Prozent der jeweiligen Kontrolle angegeben.

Die Tie2-mRNA-Expression wurde in HUVEC durch Schubspannung nicht reguliert. In HUAEC und HCAEC wurde Tie2 durch arterielle laminare Schubspannung jedoch signifikant auf das 1,5 fache der Kontrollexpression induziert (Abb. 3.19 A).

Die Angiopoietin-2-mRNA-Expression wurde in HUVEC und HCAEC durch venöse laminare Schubspannung erhöht. Diese Erhöhung durch venöse Schubspannung wurde in HUAEC nicht beobachtet. Durch arterielle Schubspannung wurde die Angiopoietin-2-mRNA-Expression jedoch in allen drei Zelltypen auf die Hälfte reduziert. (Abb. 3.19 B).

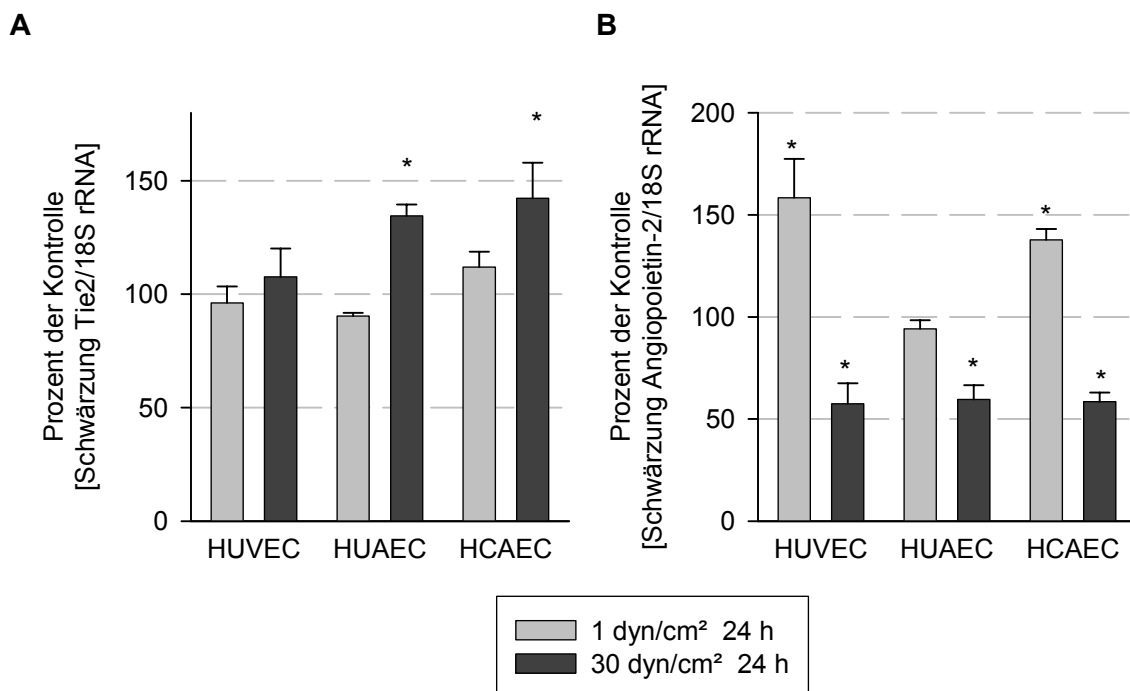


Abb. 3.19: Abhängigkeit der endothelialen mRNA-Expression von Tie2 und Angiopoietin-2 nach Schubspannung vom Gefäßtyp (HUVEC, HUAEC, HCAEC). A Tie2, B Angiopoietin-2. Angabe der Expression als Prozent der stationären Kontrolle ($n \geq 5$; * = $p \leq 0,05$ vs. stationäre Kontrolle).

3.12 Regulation von Transkriptionsfaktoren durch Schubspannung in Endothelzellen (HUVEC)

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 „activator protein-1“ (AP-1), „transcription factor SP1“ (SP1), „nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in b cells“ (NFκB), und „cAMP responsive element“ (CREB) konzentriert.

Die funktionelle Aktivierung der Transkriptionsfaktoren durch Schubspannung in Endothelzellen wurde 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/cm²) führte dagegen zu einer Herabregulation der AP-1-Transkriptionsfaktorbindungsaktivität (Abb. 3.17). 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. 3.17). Die Spezifität der AP-1-Bindung wurde parallel durch Konkurrenz mit nichtmarkierten Bindungsstellen im Überschuß gezeigt. Für die weiteren untersuchten Transkriptionsfaktoren konnte keine Regulation durch Schubspannung in Endothelzellen nachgewiesen werden.

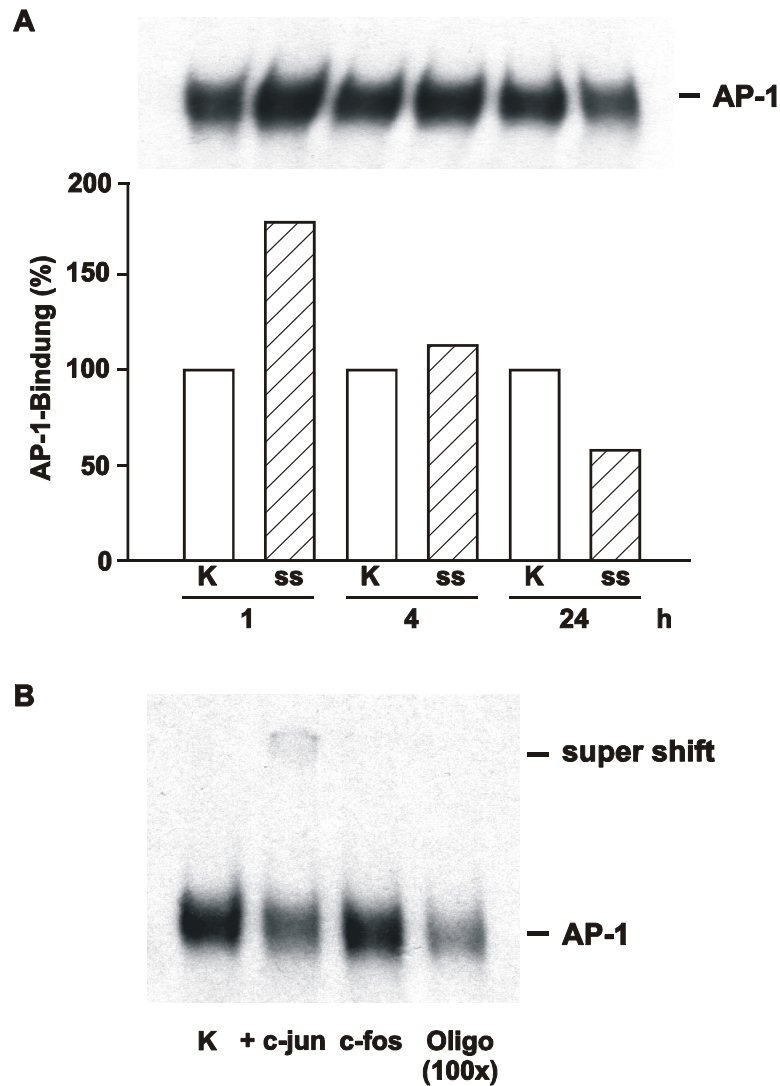


Abb. 3.17: Regulation der Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 durch Schubspannung in humanen Endothelzellen. HUVEC wurden arterieller Schubspannung (ss, 15 dyn/cm²) ausgesetzt und die AP-1-Bindung durch “electrophoretic mobility shift assay” (EMSA) in Prozent der zeitgleichen Kontrolle (K) 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 nichtmarkierten Bindungsstellen im 100-fachen Überschuss untersucht (B). Stationäre Kontrolle: offene Balken, Schubspannung: schraffierte Balken.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde im ersten Teil die Regulation von vasoaktiven Peptiden durch kardiovaskuläre Risikofaktoren, im zweiten Teil die Regulation von Mediatoren der Gefäßbildung durch biomechanische Kräfte untersucht.

4.1 Regulation von vasoaktiven Peptiden durch kardiovaskuläre Risikofaktoren

Den ersten Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bildet die Untersuchung potentieller Wechselwirkungen zwischen dem Renin-Angiotensin-System (RAS) und dem Endothelin-System. Die ppET-1-mRNA-Expression und die ET-1-Peptid-Freisetzung wird durch zahlreiche Stimuli reguliert. Dabei wird in der Mehrzahl der Untersuchungen die Endothelin-1-Expression bzw. -Sekretion durch vasoaktive Substanzen, z.B. Angiotensin II, sowie durch Thrombin in Endothelzellen gesteigert (Yanagisawa *et al.*, 1988; Emori *et al.*, 1989; Kohno *et al.*, 1991). In anderen Untersuchungen wird eine Steigerung der Endothelin-Bildung durch Hypoxie bzw. Kälberserum, jedoch nicht durch Angiotensin II beschrieben (Hieda *et al.*, 1990; Yoshida *et al.*, 1992). Dabei finden Yoshida und Mitarbeiter, obwohl Angiotensin II in unterschiedlichen Konzentrationen keinen Einfluss auf die ET-1-Sekretion hat, dass Hemmer des Angiotensin-Konvertierungs-Enzyms die Induktion der Sekretion durch Kälberserum verhindern können. Die Regulation der Expression von Isoformen des Endothelin-Konvertierungs-Enzyms (ECE) durch Angiotensin II in humanen Endothelzellen wurde bisher nicht untersucht. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Expression der ECE-1-Isoformen in Primärkulturen von humanen Endothelzellen durch Angiotensin II auch zu unterschiedlichen Zeitpunkten nicht signifikant reguliert wird. Eine Modifikation des Versuchsprotokolls mit Endothelzellmedium bei verringertem Serumanteil (0,5% Serum) und langfristiger Inkubation (24 Stunden) mit Angiotensin II in unterschiedlichen Konzentrationen hatte ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die ET-1-Sekretion. Überraschenderweise wurde die ET-1-Sekretion durch geringere Angiotensin-Konzentrationen tendenziell erhöht, ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Darüber hinaus wurden humane Endothelzellen aus der Koronararterie als zusätzliches Zellkulturmodell etabliert. Die Zellen wurden mit Angiotensin II behandelt und die Expression des Endothelin-Systems untersucht. Es wurde keine Regulation des Endothelin-Systems (ECE-1, ppET-1, ETB-Rezeptor) durch eine chronische Inkubation mit Angiotensin II nachgewiesen. Da eine Vielzahl von Mediatoren die Expression von Komponenten des Endothelin-Systems reguliert, sind möglicherweise in *in vivo*-Untersuchungen synergistische Effekte zu beobachten. So kann beispielsweise oxidiertes Low-Density-Lipoprotein die Expression des Angiotensin-Rezeptors 1 steigern (Nickenig *et*

al., 1997) und damit die Wirkung von Angiotensin II potenzieren. Endothelzellen exprimieren Angiotensin-Rezeptoren im Verhältnis 2 (Angiotensin-Rezeptor 1) : 1 (Angiotensin-Rezeptor 2) (Li *et al.*, 1999). Möglicherweise werden die Angiotensin-Rezeptoren (insbesondere AT₁, der für die Mehrzahl der pathophysiologisch relevanten Angiotensin II-Wirkungen verantwortlich ist, in unseren kultivierten Zellen nicht in ausreichender Zahl exprimiert. Obwohl der AT₁-Rezeptor in unseren Endothelzellpräparationen auf mRNA-Ebene nachweisbar ist (Dürschmidt, persönliche Mitteilung), konnte nach Angiotensin II-Inkubation in Zusammenarbeit mit Dr. Pönicke, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, keine Inositolphosphat-Bildung nachgewiesen werden. Dies spricht dafür, dass die bereits von anderen Autoren beschriebene gefäß-, präparations- und passagenabhängige Expression des AT₁-Rezeptors die wahrscheinlichste Erklärung für die variable Antwort kultivierter Endothelzellen auf Angiotensin II ist (Ko *et al.*, 1997). In tierexperimentellen Studien *in vivo* erhöht Angiotensin II dagegen die vaskuläre und renale ET-1-Bildung und die ECE-1-Aktivität (Barton *et al.*, 1997b). Möglicherweise sind dafür auch Effekte verantwortlich, die durch glatte Muskelzellen oder andere Zelltypen *in vivo* vermittelt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen dafür, dass der kardiovaskuläre Risikofaktor Adipositas das gewebständige Renin-Angiotensin-Systems (RAS) aktiviert. Dabei wird das RAS selektiv in nicht adipösem Gewebe der Niere unabhängig von morphologischen Veränderungen und Blutdruck aktiviert. Obwohl die Langzeitblockade des Endothelin-Rezeptors Typ A (ET_A-Rezeptor) keinen Effekt auf das Körpergewicht oder die renalen Endothelin-1-Gewebe-Spiegel hatte, wurde durch Behandlung mit dem ET_A-Rezeptorblocker LU135252 die Aktivierung des Angiotensin-Konvertierungs-Enzyms (ACE) vollständig verhindert. Dies deutet auf eine Rolle des ET_A-Rezeptors bei der ACE Regulation hin. Zusätzlich war die kontraktile Antwort auf Angiotensin II, die durch Zyklus-oxygenase-abhängige Vasokonstriktoren vermittelt wird, in der Aorta von adipösen C57BL/J6-Mäusen selektiv erhöht. ET_A-Rezeptorblockade als Langzeitbehandlung normalisierte die gesteigerte kontraktile Antwort auf Angiotensin II, was eine Rolle von Endothelin-1 in der Modulation von Prostanoid-vermittelten Kontraktionen nahe legt.

Der Mechanismus der Erhöhung des kardiovaskulären Risikos durch Adipositas ist wahrscheinlich multifaktoriell bedingt (Krauss *et al.*, 1998). Adipositas ist mit Änderungen des Glukose- und Lipid-Stoffwechsels verbunden (Weidmann *et al.*, 1993), beeinträchtigt die endothelabhängige Gefäß- (Steinberg *et al.*, 1996; Hashimoto *et al.*, 1998) und Nierenfunktion (Corcoran *et al.*, 1989). In Mäusen mit Angiotensin II-vermittelter Hypertonie

kommt es zu Glomerulosklerose und vaskulärer Hypertrophie (Kai *et al.*, 1998; Nishijo *et al.*, 1999). In den Untersuchungen in Zusammenarbeit mit PD Dr. Barton, Universität Zürich, wurde gezeigt, dass die renale ACE-Aktivität durch Übergewicht erhöht war. Es kam dabei zu keinen nachweisbaren strukturellen Veränderungen der Niere oder der Gefäße. Dieses unterstützt die Möglichkeit eines druckunabhängigen Mechanismus. Die organspezifische Aktivierung von ACE könnte die Zellproliferation und Vasokonstriktion (Dzau, 1986) direkt durch vermehrte Bildung von Angiotensin II oder indirekt durch Aktivierung von Endothelin-1 bewirken. Für beide Agonisten wurde ein Einfluss auf Nierenkrankheiten (Kai *et al.*, 1998; Barton *et al.*, 2000c) und vaskuläre Hypertrophie (Moreau *et al.*, 1997; Nishijo *et al.*, 1999) gezeigt. Außerdem könnte die erhöhte ACE-Aktivität zur adipositasassoziierten verringerten Nierenfunktion ohne strukturelle Manifestation beitragen (Fiske *et al.*, 1986). Weshalb die ACE-Aktivierung nur in der Niere, jedoch nicht in der Lunge der adipösen Mäuse erfolgt, ist nicht geklärt. Die Lunge ist sehr reich an gewebständigem ACE (Barnes *et al.*, 1995). Möglicherweise haben dabei der höhere Sauerstoffpartialdruck in der Lunge und der geringere Blutdruck in der pulmonalen Zirkulation einen Einfluss. Interessanterweise verhindert eine längerfristige Behandlung mit einem ET_A-Rezeptor-Antagonisten die Aktivierung des renalen Gewebs-ACE vollständig. Dies erfolgte nicht auf transkriptioneller Ebene, da die ACE-mRNA-Expression durch ET_A-Rezeptorblockade nicht verändert wurde. Auch das Körpergewicht und die renalen Endothelin-1-Gewebespiegel waren nicht involviert. Da die ET_A-Rezeptorblockade die ACE-Aktivität nicht in der Lunge und der Leber veränderte, sprechen diese Daten für eine gewebespezifische und blutdruckunabhängige Regulation der ACE-Aktivität durch Endothelin-1 *in vivo*. Die ET_A-Rezeptor-vermittelte Modulation der ACE-Aktivität könnte beispielsweise posttranslationale oder funktionelle Modifikationen des ACE-Proteins oder seiner Stabilität beinhalten.

In der Pathogenese des Adipositas-assoziierten Bluthochdrucks wird eine Rolle des Endothelin-1 diskutiert (Parrinello *et al.*, 1996; Tired *et al.*, 1999). So wird in adipösen Patienten eine beeinträchtigte Endothelfunktion beschrieben (Steinberg *et al.*, 1996; Hashimoto *et al.*, 1998). Für Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) wie ACE und Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 (AT₁-Rezeptor) konnte gezeigt werden, dass sie zu ernährungsbedingten Änderungen in der endothelialen Funktion beitragen (Wilmink *et al.*, 1999). Da sich die vaskuläre Dysfunktion gefäßspezifisch ausprägen kann (Barton *et al.*, 1997a), wurden zwei unterschiedliche Gefäßtypen der Mäuse untersucht. Angiotensin II induzierte Kontraktionen in der Aorta und der Karotis, die größtenteils durch Indometacin bzw. Thromboxan A₂-Rezeptor-Antagonisten blockiert werden konnten. Dabei zeigte sich

kein Unterschied zwischen Gefäßen von Kontrolltieren und adipösen Tieren. Dies deutet daraufhin, dass Angiotensin II-induzierte Kontraktionen die Freisetzung vasokonstriktorischer Prostanoiden zur Folge hat. Daneben wurde postuliert, dass neben Angiotensin II weitere Mediatoren an der Angiotensin II-vermittelten Vasokonstriktion beteiligt sein könnten (Takai *et al.*, 1998; Takai *et al.*, 1999). Nur in der Aorta der adipösen Mäuse wurde die kontraktile Antwort auf Angiotensin II erheblich gesteigert und durch ET_A-Rezeptorblockade vollständig verhindert. Offensichtlich beeinflusst Adipositas spezifisch die Kontraktilität nach Angiotensin II-Gabe durch eine ET_A-Rezeptor mediierte Komponente. Dabei ist diese Änderung unabhängig vom Cholesteringehalt der Gewebe und der Endothelin-Rezeptorbindungskapazität. Im Gewebe der Aorta war der ET-1-Gehalt nach ET_A-Rezeptorblockade verringert. Endothelin-1 könnte im Gewebe zur erhöhten Prostanoid-medierten vaskulären Kontraktilität *in vivo* beitragen. Dies wurde bereits in der Nierenarterie von Dahl-Ratten gezeigt (Barton *et al.*, 2000c). In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen wurde eine Rolle von Endothelin-1 bei der Vermittlung der Freisetzung von vasokonstriktorisches Prostanoiden *in vitro* gezeigt (Moreau *et al.*, 1996; Zaugg *et al.*, 1996). Die Gesamt-Cholesterin- und Triglycerid-Spiegel waren bei allen Tieren innerhalb der Normwerte. Adipositas bewirkte einen 60fachen Anstieg des LDL-Cholesterins und eine Verdreifachung des HDL-Cholesterin-Spiegels. Veränderungen im Lipidprofil wurden auch in adipösen Patienten beobachtet (Weidmann *et al.*, 1993; Riches *et al.*, 1999). Niedrige HDL-Cholesterin- im Verhältnis zu hohen LDL-Cholesterin-Spiegeln sind mit erhöhtem kardiovaskulärem Risiko assoziiert (Scandinavian *et al.*, 1994). In unseren Untersuchungen erhöhte ET_A-Rezeptor-Blockade unabhängig von Körpergewicht die Plasma-HDL-Cholesterin-Spiegel in adipösen Mäusen. Damit könnten diese Medikamente ein neues kardioprotektives Potential in adipositas-assoziierten Krankheiten darstellen.

Damit konnte gezeigt werden, dass Adipositas in Mäusen zu einer gewebespezifischen Aktivierung des renalen und vaskulären RAS führt. Dabei hat ET_A-Rezeptorblockade keinen Einfluss auf die Adipositas, kann aber die Aktivierung des RAS in den spezifischen Geweben vollständig verhindern. Die Regulation des RAS durch Endothelin könnte somit zum organprotektiven Potenzial von Endothelin-Rezeptor-Antagonisten beitragen.

Erhöhtes Alter stellt einen weiteren wichtigen kardiovaskulären Risikofaktor dar. In einem weiteren Projekt dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob der physiologische Alterungsprozess mit einer erhöhten Expression von Endothelin-1 verbunden ist. Eine erhöhte Präproendothelin-1-Expression konnte *in vivo* in intakten Arterien und der Niere

blutdruckunabhängig nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die iNOS- und eNOS-mRNA-Expression in Arterien von Tieren höheren Alters induziert ist.

In Hypertonie-induzierter vaskulärer und renaler Hypertrophie sowie bei der Progression der Arteriosklerose wird bei druckunabhängigen Mechanismen dem Endothelin-1 eine wichtige Rolle zugesprochen (Hochoer *et al.*, 1997; Moreau *et al.*, 1997; Barton *et al.*, 1998). So wurde vaskuläre Hypertrophie von intrarenalen Arterien und Glomerulosklerose in alten Tieren mit normalem Blutdruck beobachtet (K. Amann, unpublizierte Beobachtung). Ähnliche Effekte werden in normotensiven ppET-1-transgenen Tieren beschrieben (Hochoer *et al.*, 1997). Die altersabhängige transkriptionelle Aktivierung von Präproendothelin-1 in den Gefäßen könnte zu erhöhter Endothelin-1-Proteinsynthese und erhöhten Endothelin-1-Plasmaspiegel beitragen. Diese sind in Ratten höheren Alters beschrieben worden (Barton *et al.*, 1997a). Die basale Endothelin-1-Proteinexpression ist dabei in unterschiedlichen Gefäßen differentiell exprimiert, welches frühere Beobachtungen in hypertensiven Ratten erweitert (Barton *et al.*, 1997b). Die gefäßspezifische Expression von Endothelin-1 bleibt während der physiologischen Alterung erhalten.

Der Mechanismus, der die altersbedingte Induktion von Endothelin-1 vermittelt, ist nicht bekannt. Die Endothelin-1-Expression wird durch eine Reihe vasoaktiver Substanzen reguliert, die auch durch den Alterungsprozess beeinflusst werden. Zu diesen Faktoren gehören Angiotensin II (Imai *et al.*, 1992), transformierender Wachstumsfaktor (TGF- β 1) (Hahn *et al.*, 1990), reduzierte Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) (Boulanger *et al.*, 1990; Barton *et al.*, 1997a) oder Östrogen (Morey *et al.*, 1998). Darüber hinaus ist Alterung mit einer Steigerung der lokalen Spiegel freier Sauerstoffradikale (Ruiz-Torres *et al.*, 1997; Gwinner *et al.*, 1998; Reckelhoff *et al.*, 1998) verbunden. Reaktive Sauerstoffspezies könnten die Bildung von Endothelin-1 stimulieren (Gabriel *et al.*, 1998), wahrscheinlich durch transkriptionelle Aktivierung des Präproendothelin-1-Promotors (Kahler *et al.*, 2000). Vermutlich ist eine Kombination der genannten Faktoren für die gezeigte altersabhängige Induktion der Endothelin-1-Synthese verantwortlich.

In weiteren Untersuchungen wurde in der Ratten-Aorta eine altersabhängig erhöhte mRNA-Expression von iNOS und eNOS gezeigt. Dies ist ein Widerspruch zu einer vorhergehenden Studie mit 33 Monate alten weiblichen Ratten in denen eine Reduktion der eNOS-mRNA sowie der NO-Bioverfügbarkeit in Aorten-Endothelzellen gezeigt wurde (Tschudi *et al.*, 1996; Barton *et al.*, 1997a). Unsere Befunde einer erhöhten eNOS-Expression in 24 Monate alten männlichen Ratten stimmt dagegen mit der erhöhten eNOS-Proteinexpression in der Aorta von 18 Monate alten Wistar-Ratten überein (Cernadas *et al.*, 1998). Der Unterschied in

diesen Untersuchungen ist nicht klar. Mögliche Ursachen könnten unterschiedliches Geschlecht, Spezies oder Gewebezusammensetzungen (z.B. Gewebe der intakten Aorta im Gegensatz zu aus der Aorta isolierte Endothelzellen) beruhen. Zusätzlich waren die früher untersuchten weiblichen Tiere wesentlich älter. Da auch eine Abnahme der eNOS-Expression in der Aorta alter WAG/Rij-Ratten beschrieben wurde (Challah *et al.*, 1997), könnte die eNOS-Expression auch im erhöhten Alter noch signifikanten Änderungen unterliegt. Dabei sollte berücksichtigt werden, dass eine Erhöhung der eNOS-Expression nicht zwingend auch zu einer Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit führt, da eine entkoppelte eNOS auch Superoxidanionen generieren kann (Wever *et al.*, 1997; Vasquez-Vivar *et al.*, 1998; Wang W. *et al.*, 2000). Diese können durch Bildung von Peroxynitrit Stickstoffmonoxid inaktivieren. Zusätzlich konnte eine erhöhte Expression der iNOS in intakten Arterien von alten Ratten nachgewiesen werden. Möglicherweise ist dieses Enzym in alternden Arterien konstitutiv exprimiert. Die iNOS fördert die Arteriosklerosebildung und stört die endothelabhängige Gefäßfunktion (Verbeuren *et al.*, 1993; Kessler *et al.*, 1997; Behr-Roussel *et al.*, 2000; Detmers *et al.*, 2000). Das Enzym scheint in diese pathologischen Veränderungen bei älteren Menschen und Tieren involviert zu sein (Zeiger *et al.*, 1993; Barton *et al.*, 1997a). Inwieweit die erhöhte iNOS-Expression in alten Tieren auf chronischen Entzündungsreaktionen oder anderen Mechanismen beruht, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

In einer weiteren tierexperimentellen Untersuchung im Rahmen dieser Arbeit wurden EPO transgenen Mäusen, die unabhängig von Sauerstoff eine exzessive Erythrozytose (Hämatokritwerte von 80%) ausbilden, untersucht. Die Tiere entwickeln trotz der hohen Hämatokritwerte weder Bluthochdruck noch erleiden sie thromboembolische Komplikationen. Der Grund hierfür ist in einer erhöhten Bioverfügbarkeit von NO (Ruschitzka *et al.*, 2000) zu sehen. Interessanterweise konnten wir nachweisen, dass in diesen Tieren ebenfalls das Endothelin-System aktiviert ist. Die Gabe von NO-Synthase-Inhibitoren führte zum Tod der Tiere nach zwei Tagen. Diese NOS-Inhibitor-vermittelte Mortalität konnte durch gleichzeitige Blockade des ET_A-Rezeptors verzögert werden.

Die Regulation des Endothelin-Systems durch Schubspannung wird kontrovers diskutiert, da sowohl Aktivierung als auch Herabregulation *in vitro* gefunden wurde (Morawietz *et al.*, 2000b, Malek, 1999 #235). Aufgrund der verstärkten NO-Bildung und der negativen Rückkopplung auf die Endothelin-Biosynthese (Boulanger *et al.*, 1990) hätten man reduzierte Endothelin-1-Spiegel in den Tieren mit erhöhtem Hämatokrit erwartet. Darüber hinaus ist bekannt, dass verringerte Sauerstoffverfügbarkeit den Hypoxie-induzierbaren Faktor 1 α (HIF-

1 α) stabilisiert (Hofer *et al.*, 2002), der wiederum die Endothelin-1-Transkription erhöht (Hu J. *et al.*, 1998; Camenisch *et al.*, 2002). Da Erythrozytose die Sauerstofftransportkapazität des Blutes erhöht und damit die HIF-1 α Spiegel verringert, sollte man ebenfalls eine reduzierte Endothelin-1-Expression erwarten. Möglicherweise führt die exzessive Erythrozytose in diesen Tieren zu einer verringerten Sauerstoffversorgung in den Geweben, da die hohe Zelldichte in den Kapillaren die Erythrozyten an der Sauerstoffabgabe in die Gewebe hindern könnte. Somit könnte es lokal zur Hypoxie und lokal gesteigerter Endothelin-Expression kommen. Überraschenderweise fanden wir eine gesteigerte ET-1-Promotoraktivität und -gewebespiegel, die auf eine langfristige Aktivierung des Endothelin-System durch exzessive Erythrozytose *in vivo* deuten. Parallel zur gesteigerten Endothelin-Synthese kommt es zur Erhöhung der Expression beider Endothelin-Rezeptoren. Dabei ist interessant, dass die ET_B-Rezeptor-mRNA-Expression, die mit der NO-Produktion in Endothelzellen verknüpft ist (Hirata *et al.*, 1993), stärker als die ET_A-Expression erhöht ist. Dies mag auch mit der Funktion des ET_B-Rezeptors als pulmonaler Clearance-Rezeptor, gerade bei gesteigerten ET-1-Spiegeln (Fukuroda *et al.*, 1994) zusammenhängen. Entgegen der erhöhten Expression des ET_A-Rezeptors, war die kontraktile Antwort von Aortenringe auf ET-1 *in vitro* verringert. Die kontraktile Antwort auf ET-1 durch Vorinkubation mit NO-Synthase Inhibitoren war nur in den Aortenringen von transgenen Mäusen erhöht. Dies zeigt, dass *in vivo* die ET-1-Wirkung durch NO moduliert wird. Die Überlebensrate war in transgenen Tieren nach Gabe eines ET_A-Inhibitors auf die NO-Blockade durch L-NAME verdoppelt. Dies zeigt den Einfluss des aktivierten Endothelin-Systems und ist in Übereinstimmung mit der gezeigten Blutdruckerhöhung aufgrund verstärkter peripherer Vasokonstriktion nach Gabe von L-NAME *in vivo* (Ruschitzka *et al.*, 2000). Da selektive ET_A-Rezeptorantagonisten den positiven Effekt der NO-Freisetzung des ET_B-Rezeptors unbeeinflusst lassen, deuten diese Ergebnisse auf einen möglichen therapeutische Nutzen von selektiven ET_A-Rezeptorantagonisten bei exzessiver Erythrozytose gerade im Kontext der endothelialen Dysfunktion.

Zusammenfassend konnte in dieser Untersuchung gezeigt werden, dass trotz erhöhter NO-Bioverfügbarkeit bei exzessiver Erythrozytose das Endothelin-System aktiviert ist. Da die Behandlung mit einem selektiven ET_A-Rezeptorantagonisten das Überleben nach akuter NO-Blockade verlängerte, könnten therapeutische Modifikationen des Endothelin-Systems eine neue Möglichkeit in der Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen, die mit Erythrozytose verbunden sind, darstellen.

In weiteren Untersuchungen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die hämodynamische Entlastung von Patienten mit Herzinsuffizienz durch ventrikuläre Assist-Systeme (VAD) zu einer Normalisierung der erhöhten ET_A-Rezeptor-Expression führt. Dabei sind die Daten einer erhöhten ET_A-Rezeptor-Expression im insuffizienten linken Myokard in Übereinstimmung mit Arbeiten, die eine Induktion von ET_A-spezifischen Rezeptorbindungsstellen in Patienten mit Herzinsuffizienz beschreiben (Pieske *et al.*, 1999; Zolk *et al.*, 1999). Für das Myokard des linken Ventrikels wurde gezeigt, dass nur der ET_A-Rezeptor von funktioneller Bedeutung ist (Ponicke *et al.*, 1998). Diese Daten unterstützen nicht nur die Bedeutung des kardialen Endothelin-Systems bei der Herzinsuffizienz, sondern zeigen weiterhin, dass eine mechanische Entlastung des humanen linken Ventrikels von Patienten mit Herzinsuffizienz durch VAD die gesteigerte Expression von Komponenten des Endothelin-Systems *in vivo* verringert. Endothelin-1 stimuliert über den ET_A-Rezeptor Hypertrophie, Kontraktilität, Proteinbiosynthese und Hydrolyse von Phosphatidylinositol in Kardiomyozyten (Suzuki *et al.*, 1990; Sugden *et al.*, 1993; Zeiher *et al.*, 1993; Barton *et al.*, 1997a). In experimentellen Studien wurde durch chronische Endothelin-Rezeptorblockade die kardiale Funktion verbessert, die Progression der Ventrikeldilatation vermindert (Fraccarollo *et al.*, 1997) und die Mortalitätsrate in einem Infarktmodell gesenkt (Sakai *et al.*, 1996). In hypertensiven Ratten verringerte chronische ET_A-Rezeptorblockade die Hypertrophie des linken Ventrikels unabhängig vom Blutdruck (Ehmke *et al.*, 1999). Die gefundene erhöhte Expression des ET_A-Rezeptors im insuffizienten Myokard könnte einen neuen Ansatzpunkt für die Behandlung der Herzinsuffizienz mittels ET_A-Rezeptorantagonisten darstellen. In den untersuchten Patienten konnte dabei kein Effekt durch die Behandlung mit ACE-Hemmern, der aktuellen Standardtherapie, auf die gesteigerte ET_A-Rezeptor-Expression gefunden werden. Aufgrund des geringen zur Verfügung stehenden Materials konnte die ET_A-Rezeptor-Expression nur auf mRNA Ebene quantifiziert werden. Daher kann nicht detailliert untersucht werden, ob die gesteigerte ET_A-Rezeptor-Expression auf einer Steigerung der Expression in Myozyten oder anderen im Homogenat vorhandenen Zelltypen (z.B.: Endothelzellen, glatte Muskelzellen oder Fibroblasten) beruht. Endothelzellen exprimieren jedoch nur den ET_B-Rezeptor (Heinroth-Hoffmann *et al.*, 1998). Die Anzahl der Endothelin-Rezeptoren auf glatten Muskelzellen und Fibroblasten übersteigt nicht ihre Zahl auf Myozyten. Außerdem wurde eine erhöhte ET_A-Rezeptordichte im insuffizienten Myokard beschrieben (Pieske *et al.*, 1999). Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass die erhöhte ET_A-Rezeptor-mRNA-Expression eine erhöhte ET_A-Rezeptor-Proteinexpression und -Funktion in den Myozyten von Patienten mit Herzinsuffizienz widerspiegelt.

Die durch VAD normalisierte ET_A-Rezeptor-Expression könnte eine Konsequenz der teilweisen Erholung des insuffizienten Myokards durch hämodynamische Entlastung darstellen. Als kritischer Faktor für die Progression der Herzinsuffizienz wird die Dehnung der Myozyten durch die Überlast angesehen. Die VAD-Implantation führte wahrscheinlich zu einer Verbesserung der kardialen Funktion und des kritischen hämodynamischen Status vor der Implantation. Die angenommenen Verbesserungen konnten nicht exakt quantifiziert werden, da ein zeitweiliges Abschalten des VAD für den Zeitraum der Messung hämodynamischer Parameter ein zu großes Risiko für die Patienten bedeutet hätte. Jedoch zeigt die Abnahme des pulmonalen Kapillardrucks und die Erhöhung des Herzindex eine teilweise Verbesserung infolge mechanischer Entlastung durch VAD (Daten vorliegend für 4 von 10 Patienten kurz vor der Herztransplantation durch Lungenkatheter oder durch transthorakale Echokardiographie bestimmt). Überdies konnte keine Änderung in der Expression von Indikatoren für die Einwanderung inflammatorischer Zellen während der Zeit mit VAD im Myokard des linken Ventrikels der Patienten festgestellt werden (Bartling *et al.*, 1999).

Die Expression des ET_B-Rezeptors war im insuffizienten Myokard von Patienten mit oder ohne ACE-Inhibitor-Therapie nicht verändert. ET_B-Rezeptorbindungsstudien im Myokard von Patienten mit Herzinsuffizienz sind in der Literatur widersprüchlich. Während eine Gruppe eine Herabregulation der ET_B-Bindungsstellen beschreibt (Zolk *et al.*, 1999), finden zwei weitere Gruppen in ihren Untersuchungen keine Unterschiede in der Anzahl der ET_B-Bindungsstellen im insuffizienten humanen Myokard (Ponicke *et al.*, 1998; Pieske *et al.*, 1999). Die letztgenannten Befunde würden unsere mRNA-Expressionsdaten unterstützen. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten auch Unterschiede in den untersuchten Patientenpopulationen dokumentieren. Die mechanische Entlastung durch VAD beeinflusst die ET_B-Expression nicht. Dieses Ergebnis unterstützt die Bedeutung der beobachteten Normalisierung der gesteigerten ET_A-Expression durch VAD.

Die gesteigerte ECE-1-Expression in Myokard des linken Ventrikels von Patienten mit Herzinsuffizienz deutet auf eine mögliche neue Strategie in der Behandlung der Herzinsuffizienz durch ECE-Inhibition hin. Diese Regulation wurde nicht nur im Myokard des linken Ventrikels, sondern auch im Vorhofmyokard von Patienten mit Herzinsuffizienz gefunden. Die lokal erhöhte ECE-1-Expression im insuffizienten Myokard könnte eine erhöhte lokale ET-1 Synthese in den Kardiomyozyten sowie eine erhöhte proteolytische Spaltung von systemisch erhöhtem BigET-1 in Patienten mit Herzinsuffizienz bewirken. Die gemessenen ET-1-Gewebespiegel deuten auf eine erhöhte lokale ET-1-Synthese im

insuffizienten Myokard hin. Interessanterweise wird die erhöhte ECE-1-Expression im insuffizienten humanen Myokard durch ACE-Inhibitor-Therapie teilweise normalisiert. Diese Daten deuten auf einen zusätzlichen positiven Effekt dieser Therapie hin. Trotzdem war die ECE-1-Expression auch in Patienten mit ACE-Inhibitor-Therapie noch leicht erhöht, was eine mögliche weitere positive Beeinflussung der Herzinsuffizienz durch eine ECE-Inhibitor-Therapie unterstützt. Der Effekt der Therapie könnte auch die Unterschiede zu anderen Untersuchungen erklären, die keine signifikanten Veränderungen in der ECE-1-Expression im insuffizienten humanen Myokard des linken Ventrikels nachweisen konnten (Zolk *et al.*, 1999). Die myokardiale ECE-1-Expression wurde durch mechanische Entlastung mit VAD nicht beeinflusst. Die reduzierte ET_A-Expression wird damit nicht durch eine geänderte ECE-1-Expression im Myokard von Patienten mit VAD-Unterstützung aufgehoben. Dies verstärkt den positiven Effekt der Normalisierung der ET_A-Rezeptor-Expression zusätzlich.

4.2 Regulation von Mediatoren der Gefäßbildung durch biomechanische Kräfte

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation von Mediatoren der Gefäßbildung und -differenzierung durch biomechanische Kräfte untersucht. Den Schwerpunkt bildete dabei die Regulation des Ephrin/Eph- und des Angiopoietin/Tie-Systems durch Schubspannung in venösen und arteriellen Endothelzellen.

Die bisherigen Erkenntnisse zur Expression des Ephrin/Eph-Systems basieren fast ausschließlich auf Untersuchungen im Maus-Embryo. Daher wurden zunächst Methoden entwickelt, um die Expression von Ephrin-B2 und EphB4 in humanen Endothel- und glatten Muskelzellen vergleichend zu quantifizieren. Die *real time*-PCR erwies sich dabei als praktikable Methode zur mRNA-Quantifizierung. Ephrin-B2 ist in Endothelzellen aus Nabelschnurarterien (HUAEC) höher exprimiert, als in Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC). Dies ist in prinzipieller Übereinstimmung mit den Befunden im Maus-Embryo (Gerety *et al.*, 1999). Die dort beschriebene exklusive Expression von Ephrin-B2 in embryonalen arteriellen Endothelzellen konnte jedoch in unseren humanen Endothelzellen, insbesondere den vergleichend analysierten Endothelzellen aus Koronararterien, nicht verifiziert werden. Dies könnte entwicklungs- oder speziesspezifisch determiniert sein. Eine veränderte Expression unter Kulturbedingungen ist eher unwahrscheinlich, da auch in frisch isolierten Endothelzellen ohne anschließende Kultivierung und durch *in situ*-Hybridisierung Ephrin-B2 in Endothelzellen arterieller und venöser Gefäße nachgewiesen werden konnte. Interessanterweise wird Ephrin-B2 deutlich höher in Endothel-, als in glatten Muskelzellen

exprimiert. Dies könnte eine Rolle bei der Differenzierung und Migration dieser Zelltypen im Rahmen der Gefäßbildung bzw. des Remodeling spielen. Durch *in situ*-Hybridisierung konnte Ephrin-B2 in den Endothelzellen von Nabelschnurvenen und -arterien, der Aorta sowie in Kapillargefäßen des linken und rechten Ventrikels nachgewiesen werden. Auch in diesen Untersuchungen war Ephrin-B2 nicht in den benachbarten glatten Muskelzellen signifikant exprimiert. Dies unterstützt unsere *in vitro*-Befunde zur Ephrin-B2-Expression *in vivo*. Der im Maus-Embryo präferentiell venös exprimierte EphB4-Rezeptor war in allen untersuchten Endothel- und glatten Muskelzellen auf deutlich niedrigerem Niveau auf mRNA-Ebene nachweisbar. Auch hier war keine eindeutige differentielle Expression auf arteriellen bzw. venösen Endothelzellen erkennbar. Unsere Befunde deuten daraufhin, dass die vorrangige Expression von Ephrin-B2 auf arteriellen und von EphB4 auf venösen Endothelzellen in der Embryonalentwicklung bei der Vaskulogenese bzw. Angiogenese eine wichtige Rolle spielt, im adulten Gewebe aber nur bedingt erhalten bleibt.

Um erste Rückschlüsse auf die funktionelle Relevanz von Ephrin-B2 und EphB4 für die Adhäsion bzw. Proliferation von Endothelzellen zu erhalten, wurden HUVEC auf Zellkulturschalen mit Fc-Chimären-Beschichtung untersucht. Sowohl Ephrin-B2 als auch EphB4 zeigten dabei konzentrationsabhängig deutlich repulsive Eigenschaften. Auch die Migration bzw. das Einwachsen von HUVEC aus benachbarten unbeschichteten Bereichen war deutlich eingeschränkt. Diese Befunde sind in Übereinstimmung mit den repulsiven Eigenschaften von Ephrin-Liganden und Eph-Rezeptoren in der Differenzierung von Nervenzellen (Zhou, 1998). Dabei scheinen die Proteine der Ephrin/Eph-Familie die räumliche Verteilung von Zellen in sich entwickelnden Gewebe bzw. Embryo zu steuern.

In weitergehenden Studien wurde die Regulation von Ephrin-B2 und EphB4 durch laminare Schubspannung in Endothelzellen untersucht. Die Ephrin-B2-mRNA wird zeit- und dosisabhängig durch laminare Schubspannung auf Gelatine-beschichteten Zellkulturschalen in venösen Endothelzellen (HUVEC) herabreguliert. Die Herabregulation von Ephrin-B2 durch chronische arterielle Schubspannung ist vor der initial postulierten präferentiellen Expression von Ephrin-B2 in arteriellen Endothelzellen überraschend. In den bereits dargestellten *in vivo*-Untersuchungen in Gewebeschnitten konnte jedoch diese präferentielle Ephrin-B2 Expression in Maus-Embryonen im humanen Gewebe nicht bestätigt werden. Die Herabregulation von Ephrin-B2 durch Schubspannung kann vor diesem Hintergrund als ein molekularer Mechanismus der Adaptation an einen nicht aktivierten, ruhenden endothelialen Phänotyp angesehen werden. Dies ist in Übereinstimmung mit bisherigen Untersuchungen, die eine Hemmung der Proliferation (Akimoto *et al.*, 2000) und der Apoptose (Dimmeler *et al.*, 1996;

Bartling *et al.*, 2000) durch chronische laminare Schubspannung in Endothelzellen zeigen. Inwiefern die auf mRNA-Ebene gezeigte Herabregulation von Ephrin-B2 auch auf Proteinebene übertragbar ist, kann aufgrund der mangelnden Verfügbarkeit von anwendbaren humanen Ephrin-B2-Antikörpern derzeit nicht beantwortet werden. Eigene Experimente zur Herstellung geeigneter Antikörper waren bis zur Expression des humanen Ephrin-B2 in *E.coli* erfolgreich, nach erfolgter Immunisierung konnten jedoch bisher keine funktionell aktiven Antiseren gewonnen werden. Dies ist derzeit ein generelles Problem der Arbeiten auf diesem Gebiet. Der korrespondierende EphB4-Rezeptor wird auf mRNA-Ebene dagegen transient durch Schubspannung in HUVEC induziert. Auch in diesem Fall ist durch das Fehlen geeigneter Antikörper eine Verifizierung auf Proteinebene noch nicht möglich. Da der Focus auf chronische Veränderung des endothelialen Phänotyps durch Schubspannung gelegt wurde, erfolgten alle Untersuchungen zur Signaltransduktion nach 24 Stunden. Als erster potenzieller Mechanismus für die spezifische Antwort auf biomechanische Stimulation wurde der Einfluss unterschiedlicher extrazellulärer Matrices untersucht. Die Herabregulation von Ephrin-B2 in HUVEC auf Gelatine-beschichteten Zellkulturschalen war auf Kollagen I und Laminin nicht länger nachweisbar. Dies spricht dafür, dass spezifische Matrix-Integrin-Wechselwirkungen an der Erkennung und Weiterleitung von Schubspannung in die Endothelzelle beteiligt sind. In den letzten Jahren gibt es in der Literatur vermehrt Hinweise, dass Zell-Matrix-Interaktionen entscheidend für die Erkennung und Art der zellulären Antwort auf unterschiedliche mechanische Stimuli sind. So konnte gezeigt werden, dass glatte Muskelzellen auf Kollagen I und Fibronectin verstärkt proliferieren, während sie sich auf Laminin verstärkt differenzieren (Wilson *et al.*, 1993; Reusch *et al.*, 1996). Diese matrix-spezifische Antwort auf mechanische Dehnung wird durch eine matrix-abhängige Aktivierung von Transkriptionsfaktoren reguliert (Ling *et al.*, 1999; Morawietz *et al.*, 1999). Auch die schubspannungsabhängige Regulation der Vasodilatation von koronaren Gefäßen und der endothelialen NO-Freisetzung wird durch Integrin- und Laminin-bindende Protein-vermittelte Zell-Matrix-Interaktionen beeinflusst (Muller *et al.*, 1997; Gloe *et al.*, 1999). Die Herabregulation von Ephrin-B2 durch Schubspannung kann durch Hemmung der Proteinkinase C (PKC) verhindert werden. Eine Reihe von intrazellulären Prozessen wird PKC-abhängig durch Schubspannung reguliert. Dies ist gleichzeitig der erste Befund in der Literatur, dass die Ephrin-B2-Expression durch PKC reguliert wird. Schubspannung erhöht transient die PKC-Immunfluoreszenz (Hu Y. L. *et al.*, 1997) und aktiviert die extrazelluläre Signal-regulierte Kinase (ERK1/2) PKC-abhängig in Endothelzellen (Takahashi *et al.*, 1996). Die schubspannungsabhängige Induktion der Expression von PDGFA und B (Hsieh *et al.*,

1992), c-fos (Hsieh *et al.*, 1993), und dem „heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor“ (HB-EGF) (Morita *et al.*, 1993) ist ebenfalls PKC-abhängig. Eine PKC-abhängige Herabregulation von Genen durch chronische Applikation von Schubspannung ist dagegen bisher noch nicht beschrieben worden. Die schubspannungsabhängige Reduktion der Ephrin-B2-Expression scheint auch Tyrosinkinase-abhängig zu sein. Tyrosinkinasen wurden als Mechanosensoren für die intrazelluläre Weiterleitung biomechanischer Stimuli postuliert (Chen *et al.*, 1999). Schubspannung erhöht die eNOS-Expression- und Aktivität über einen Tyrosinkinase-c-Src-abhängigen Signalweg (Ayajiki *et al.*, 1996; Davis M. E. *et al.*, 2001). Wir konnten kürzlich die Herabregulation der Tyrosylprotein-Sulfotransferase-Isoform 1 durch arterielle Schubspannung auf einem Tyrosinkinase-abhängigen Signalweg zeigen (Goettsch S. *et al.*, 2002). Diese Befunde unterstützen eine Rolle von Tyrosinkinasen bei der beschriebenen Ephrin-B2-Regulation durch Schubspannung.

In weitergehenden Analysen wurde die Regulation von Ephrin-B2 und EphB4 durch Schubspannung in venösen und arteriellen Endothelzellen verglichen. Interessanterweise wurde die Ephrin-B2-Expression in venösen Zellen (HUVEC) herabreguliert, in arteriellen Zellen der Nabelschnur (HUAEC) oder der Koronararterie (HCAEC) nicht herabreguliert. Diese Daten sprechen für eine unterschiedliche intrazelluläre Antwort auf gleiche biomechanische Stimuli in venösen und arteriellen Zellen. Vergleichende Befunde zur mechanischen Stimulation von arteriellen bzw. venösen Gefäßzellen sind in der Literatur selten. Mechanische Dehnung führt zu einer Herabregulation der Prostazyklin-Bildung in arteriellen und venösen Endothelzellen. Die höhere Dehnung von arteriellen Endothelzellen könnte so die höhere Prostazyklin-Sekretion von venösen im Vergleich zu arteriellen Endothelzellen erklären, die von der Mehrzahl der Autoren beschrieben wird (Upchurch *et al.*, 1989). Klinisch bedeutsam ist in diesem Zusammenhang die verstärkte proliferative Antwort von glatten Muskelzellen der *Vena saphena magna* im Vergleich zu Zellen der *Arteria mammaria interna* auf erhöhte mechanische Dehnung, die zu der höheren Restenoserate von Venen-Bypässen beitragen könnte (Predel *et al.*, 1992). Die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix könnte in venösen bzw. arteriellen Endothelzellen durch mechanische Kräfte unterschiedlich reguliert sein. Während chronische laminare Schubspannung in venösen Endothelzellen zu einer reduzierten Fibronectin-Synthese führt (Gupte *et al.*, 1990), induziert arterielle Schubspannung in arteriellen Endothelzellen die endotheliale Fibronectin- und Laminin-Bildung (Thoumine *et al.*, 1995).

In weitergehenden Analysen wurde die Regulation des Angiopoietin/Tie-Systems durch Schubspannung in humanen Endothelzellen untersucht. Angiopoietin-2 ist zeitabhängig durch

arterielle Schubspannung herabreguliert. Dies ist in Übereinstimmung mit der kürzlich beschriebenen Herabregulation der Angiopoietin-2-mRNA im Rahmen eines differential display-Ansatz zur Identifizierung Schubspannungsregulierter Gene (Bongrazio *et al.*, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Befund durch detaillierte Zeit- und Dosisstudien sowie Untersuchungen zur Signaltransduktion erweitert. Überraschenderweise finden wir eine Induktion der Angiopoietin-2-Expression bei venöser Schubspannung, während arterielle Schubspannung Angiopoietin-2 herabreguliert. Diese Ergebnisse lassen sich auch auf Proteinebene bestätigen. Diese Daten sprechen für eine höhere angiogene Aktivierbarkeit bei niedriger Schubspannung. Die Herabregulation von Angiopoietin-2 durch höhere arterielle Schubspannung kann dagegen erneut als Adaptation an einen ruhenden Endothelzell-Phänotyp interpretiert werden, der die vaskuläre Integrität stabilisiert.

Im Gegensatz zu Ephrin-B2 wird Angiopoietin-2 auch auf Kollagen I- und Laminin durch arterielle Schubspannung herabreguliert. Dies unterstützt die matrixspezifische Antwort der Ephrin-B2-Expression, spricht jedoch gegen eine Integrin- oder Laminin-binding Protein-vermittelte Herabregulation von Angiopoietin-2 durch arterielle Schubspannung. Die Herabregulation von Angiopoietin-2 durch arterielle Schubspannung ist wie Ephrin-B2 PKC-vermittelt. Bereits beschrieben sind bisher eine PKC-vermittelte Induktion von Angiopoietin-2 durch VEGF und Hypoxie (Oh *et al.*, 1999; Yuan *et al.*, 2000) sowie Angiotensin II in Endothelzellen (Fujiyama *et al.*, 2001; Otani *et al.*, 2001). Dabei handelt es sich jeweils um transiente Induktionen der Angiopoietin-2-Expression. Unsere Daten fokussieren jedoch auf langfristige Änderungen der Angiopoietin-2-Genexpression. Tyrosinkinase sind im Gegensatz zu Ephrin-B2 in die Herabregulation von Angiopoietin-2 nicht involviert. Das unterstützt die Spezifität des Ephrin-B2-Befundes. Der korrespondierende Tie2-Rezeptor wird dagegen durch Schubspannung auf Gelatine-beschichteten Schalen nicht reguliert. Eine kompensatorische Regulation wie beim Ephrin-B2/EphB4-Ligand/Rezeptor-Paar konnte damit in venösen Zellen nicht beobachtet werden. Besonders interessant sind die vergleichenden Untersuchungen zur Regulation von Angiopoietin-2 und Tie2 durch Schubspannung in venösen und arteriellen Endothelzellen. Während die Herabregulation von Angiopoietin-2 durch arterielle Schubspannung in venösen und arteriellen Endothelzellen nachgewiesen wurde, erfolgte im Gegensatz zu venösen in arteriellen Endothelzellen keine Induktion bei venöser Schubspannung. Wahrscheinlich ist die gefäßspezifische Differenzierung für diese unterschiedliche intrazelluläre Antwort auf identische biomechanische Stimuli verantwortlich. Die mehrfach passagierten arteriellen Koronarendothelzellen liegen aufgrund ihres aktivierten eher proliferativen Phänotyp in der

Stärke ihrer Antwort zwischen beiden Zelltypen. Die gefäßspezifische Regulation ist auch für den Rezeptor Tie2 nachweisbar, der in venösen Zellen nicht, in arteriellen Endothelzellen dagegen induziert wird. Damit ist in arteriellen Endothelzellen eine vergleichbare kompensatorische Expression des Angiopoietin-2/Tie2-Ligand/Rezeptor-Paars zu beobachten, wie für das Ephrin-B2/EphB4 Paar in venösen Endothelzellen.

Um erste Hinweise auf Transkriptionsfaktoren zu erhalten, die diese differentielle mRNA-Expression durch Schubspannung vermitteln, wurden electrophoretic mobility shift assays (EMSA) durchgeführt. Wir konnten dabei eine transiente Induktion der Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1, jedoch eine verringerte Bindungsaktivität nach chronischer Applikation arterieller Schubspannung in venösen Endothelzellen nachweisen. Da Ephrin-B2 und Angiopoietin-2 potentielle AP-1-Bindungsstellen in ihrem Promotor besitzen, könnte AP-1 (wahrscheinlich als c-jun Homodimer) in die Herabregulation durch arterielle Schubspannung in HUVEC involviert sein. Ein weiterer interessanter Kandidat ist NF- κ B, der ebenfalls durch Schubspannung transient induziert, jedoch chronisch herabreguliert wird (Mohan *et al.*, 1997).

Zusammenfassend konnte damit eine Regulation von Genen des Ephrin-B2/EphB4- bzw. Angiopoietin-2/Tie2-Systems durch biomechanische Stimuli in humanen Endothelzellen nachgewiesen werden. Die intrazelluläre Antwort ist zum Teil gefäßspezifisch und involviert PKC, Tyrosinkinasen und Zell-Matrix-Interaktionen. Die Herabregulation von Ephrin-B2 und Angiopoietin-2 spricht für eine Differenzierung in einen ruhenden Endothelzellphänotyp durch arterielle laminare Schubspannung. Dies könnte zum antiangiogenen und die Gefäßintegrität stabilisierenden Effekt von laminarer Schubspannung beitragen.

5. Zusammenfassung

Die Entwicklung chronischer Erkrankungen ist häufig nicht monogen bzw. monofaktoriell bedingt. Die Pathogenese beinhaltet zunehmende Fehlregulationen von Körperfunktionen durch äußere und innere Risikofaktoren. Dabei bilden Gefäßerkrankungen die Grundlage für die häufigsten Todesursachen in den Industrieländern. Lokal und systemisch erhöhte Endothelin-Spiegel könnten an der Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen beteiligt sein. In der vorliegenden Arbeit wurde im ersten Teil die Regulation von vasoaktiven Peptiden, mit Schwerpunkt Endothelin-System, durch kardiovaskuläre Risikofaktoren, sowie im zweiten Teil die Regulation von Mediatoren der Gefäßbildung durch biomechanische Kräfte untersucht.

Die Bildung des Vasokonstriktors Endothelin erfolgt proteolytisch durch das Endothelin-Konvertierungs-Enzym aus dem Vorläuferpeptid Big-Endothelin. Im ersten Teil wurde eine direkte Beeinflussung der Expression des Endothelin-Konvertierungs-Enzyms durch Angiotensin II in Endothelzellen, dem Hauptbildungsort von Endothelin untersucht. In unterschiedlichen Zellkulturmodellen (HUVEC, HCAEC) konnte keine direkte Beeinflussung der mRNA-Expression des Endothelin-Konvertierungs-Enzyms oder der Anteile der einzelnen Isoformen an der ECE-1-Gesamtexpression nachgewiesen werden.

Der Einfluss von Übergewicht auf das Renin-Angiotensin- und Endothelin-System wurde in C57B2/6J Mäuse untersucht. In der Niere der übergewichtigen Tiere wurde das Angiotensin-Konvertierungs-Enzym (ACE) aktiviert. Diese ACE-Aktivierung wurde durch Gabe des Endothelin-Rezeptor-Typ A-Antagonisten verhindert. RT-PCR-Analysen zeigten, dass diese Aktivierung in der Niere nicht transkriptionell mediiert ist.

Der Einfluss des Risikofaktors Alter auf die Gefäßintegrität und die Expression von ppET-1 wurde in Gefäße von jungen und alten Ratten analysiert. Blutdruckunabhängig wurde im Alter der Endothelin-1-Peptidgehalt in allen untersuchten Gefäßen fast verdoppelt. RT-PCR-Analysen zeigten, dass die vermehrte Endothelin-1-Synthese auf einer erhöhten ppET-1 mRNA-Expression beruht. Ebenfalls deutlich erhöht war die eNOS- und iNOS-mRNA-Expression in der abdominalen Aorta der alten Tiere.

Der Einfluss erhöhter Bioverfügbarkeit von NO auf die Aktivität des Endothelin-Systems wurde in sauerstoffunabhängig Erythropoietin (EPO)-überexprimierenden transgenen Mäusen untersucht. Das Endothelin-System der transgenen Tiere ist aktiviert. Die mRNA-Expression der Endothelin-Rezeptoren A und B ist in den transgenen Mäusen induziert. Diese Induktion wird durch die Gabe eines spezifischen Endothelin-Rezeptor-A-Antagonisten noch verstärkt.

In atrialem und ventrikulärem Myokard von Patienten mit Herzinsuffizienz bzw. koronarer Herzkrankheit wurde die Expression des Endothelin-Systems und der Endothelin-1-Peptidgehalt bestimmt. Die Expression des Endothelin-Konvertierungs-Enzyms (ECE) ist im Ventrikel von Patienten mit Herzinsuffizienz erhöht. Diese erhöhte Expression wird durch die ACE-Inhibitor-Therapie teilweise normalisiert. Der Endothelin-1-Peptid-Gehalt im Myokard korreliert mit der Expression des Endothelin-Konvertierungs-Enzyms.

In Biopsien der *Arteria mammaria interna* von Patienten mit koronarer Herzkrankheit wurde die Expression der ECE-1-Isoformen quantifiziert. Dabei wurde untersucht, ob Reduzierung des Ang II-Spiegels durch medikamentöse ACE-Hemmer-Therapie, Blockade der Ang II-Wirkung durch Behandlung mit AT₁-Rezeptorantagonisten oder Modulation des Lipidprofils durch Cholesterinsyntheseenzym-(CSE)-Hemmern die ECE-1-Isoform-mRNA-Expression beeinflusst. Medikamentöse Behandlung mit einem AT₁-Rezeptorantagonisten führte zu einer signifikanten Herabregulation der ECE-1-mRNA-Expression im Vergleich zu Patienten mit CSE-Hemmer-Therapie. Diese Herabregulation der ECE-1-mRNA-Expression beruht hauptsächlich auf der signifikanten Reduktion der ECE-1a-mRNA-Expression in Patienten mit AT₁-Hemmer-Therapie. Die ECE-1a-mRNA war in Patienten mit AT₁-Blockade darüber hinaus niedriger exprimiert, als in Patienten mit ACE-Hemmer-Therapie.

Obwohl in den Zellkulturexperimenten eine direkte Wechselwirkung des Renin-Angiotensin-Systems mit dem Endothelin-System nicht nachgewiesen werden konnte, wurde in unterschiedlichen Tiermodellen sowie in humanen Gewebeproben Wechselwirkungen beider Systeme indirekt nachgewiesen. Die zugrundeliegenden Signalmechanismen, Wechselwirkungen mit weiteren Mediatorsystemen und unterschiedlicher Zelltypen oder der Einfluß gefäßtypischer Differenzierung von Endothelzellen, muss in weitergehenden Untersuchungen analysiert werden.

Biomechanische Kräfte wirken ständig auf die Endothelzellen der Gefäßwand und bewirken dadurch die Freisetzung biologisch aktiver Mediatoren. Der Einfluß veränderter biomechanischer Kräfte auf die phänotypische Differenzierung der Endothelzellen sollte am Beispiel der Expression von Mediatoren der Gefäßbildung und -Identität, dem Ephrin/Eph- und dem Angiopoietin/Tie-System, im zweiten Teil der Arbeit untersucht werden.

In initialen Untersuchungen wurde die Ephrin-B2-Expression in unterschiedlichen humanen Geweben durch *in situ*-Hybridisierung nachgewiesen. In primären humanen Endothelzellkulturen wurde dann der Einfluss von laminarer Schubspannung untersucht. Die Ephrin-B2-mRNA-Expression wird durch arterielle laminare Schubspannung in HUVEC zeit- und dosisabhängig auf die Hälfte nach 24 Stunden verringert. Diese Herabregulation kann durch

Hemmung der Proteinkinase C sowie durch Hemmung von Tyrosinkinasen verhindert werden. Werden die venösen Endothelzellen auf Kollagen I bzw. auf Laminin kultiviert, so konnte ebenfalls keine Herabregulation der Ephrin-B2-mRNA-Expression beobachtet werden. Interessanterweise reagieren arterielle Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUAEC) nicht mit Herabregulation der Ephrin-B2-mRNA auf arterielle laminare Schubspannung.

Der EphB4-Rezeptor wird in HUVEC transient nach 4 Stunden arterieller laminarer Schubspannung induziert, seine Expression fällt nach 12 Stunden wieder auf Kontrollniveau. Funktionell verhindert sowohl Ephrin-B2 als auch EphB4 dosisabhängig die Anheftung sowie die Migration unterschiedlicher Endothelzelltypen (HUVEC, HUAEC, HCAEC).

Angiopoietin-2 wird durch laminare venöse Schubspannung (1 dyn/cm² für 24 h) induziert, durch arterielle Schubspannung jedoch zeit- und dosisabhängig herabreguliert. Dabei ist die Angiopoietin-2-mRNA-Expression nach 12 Stunden maximal verringert, um nach 24 Stunden etwa 50% der Expression der stationären Kontrolle zu erreichen. Diese Reduktion bleibt zumindest auf Proteinebene bis zu 80 Stunden erhalten und stellt somit eine langfristige Adaptation der Angiopoietin-2-Expression an arterielle laminare Schubspannung dar. Diese Herabregulation wird durch unterschiedliche Matrices (Gelatine, Kollagen I, Laminin) nicht beeinflusst. Die Herabregulation kann durch Blockade des Proteinkinase C-Signalwegs verhindert werden. Dagegen hat die Blockade von Tyrosinkinasen keinen Einfluss auf die Herabregulation der Angiopoietin-2-mRNA-Expression. Interessanterweise erfolgt die in venösen Zellen beobachtete Induktion der Angiopoietin-2-mRNA-Expression durch venöse laminare Schubspannung nicht in arteriellen Endothelzellen der gleichen Nabelschnur (HUAEC). Die Herabregulation von Angiopoietin-2-mRNA erfolgt dagegen durch arterielle laminare Schubspannung in arteriellen und venösen Endothelzellen gleichermaßen.

Der Angiopoietin-2 Rezeptor Tie2 wird in HUVEC nicht durch Schubspannung reguliert. In arteriellen Endothelzellen wird die Tie2-mRNA-Expression dagegen durch chronische arterielle laminare Schubspannung (30 dyn/cm² für 24 h) induziert.

Zusammenfassend konnte damit eine Regulation von Genen des Ephrin-B2/EphB4- bzw. Angiopoietin-2/Tie2-Systems durch biomechanische Stimuli in humanen Endothelzellen nachgewiesen werden. Die intrazelluläre Antwort ist zum Teil gefäßspezifisch und involviert PKC, Tyrosinkinasen und Zell-Matrix-Interaktionen. Die Herabregulation von Ephrin-B2 und Angiopoietin-2 spricht für eine Differenzierung in einen ruhenden Endothelzellphänotyp durch arterielle laminare Schubspannung. Dies könnte zum antiangiogenen und die Gefäßintegrität stabilisierenden Effekt von laminarer Schubspannung beitragen.

6. Literatur

- Abassi ZA, Golomb E, Bridenbaugh R, Keiser HR (1993). Metabolism of endothelin-1 and big endothelin-1 by recombinant neutral endopeptidase EC.3.4.24.11.
Br J Pharmacol, **109**:1024-8.
- Adams RH, Wilkinson GA, Weiss C, Diella F, Gale NW, Deutsch U, Risau W, Klein R (1999). Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis.
Genes Dev, **13**:295-306.
- Akimoto S, Mitsumata M, Sasaguri T, Yoshida Y (2000). Laminar shear stress inhibits vascular endothelial cell proliferation by inducing cyclin-dependent kinase inhibitor p21(Sdi1/Cip1/Waf1).
Circ Res, **86**:185-90.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.
Nucleic Acids Res, **25**:3389-402.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. (1997) Current protocols in molecular biology.
Brooklyn, N. Y.: J. Wiley & Sons, Inc.
- Ayajiki K, Kindermann M, Hecker M, Fleming I, Busse R (1996). Intracellular pH and tyrosine phosphorylation but not calcium determine shear stress-induced nitric oxide production in native endothelial cells.
Circ Res, **78**:750-8.
- Azarani A, Boileau G, Crine P (1998). Recombinant human endothelin-converting enzyme ECE-1b is located in an intracellular compartment when expressed in polarized Madin-Darby canine kidney cells.
Biochem J, **333**:439-48.
- Barnes K, Brown C, Turner AJ (1998). Endothelin-converting enzyme: ultrastructural localization and its recycling from the cell surface.
Hypertension, **31**:3-9.
- Barnes K, Murphy LJ, Takahashi M, Tanzawa K, Turner AJ (1995). Localization and biochemical characterization of endothelin-converting enzyme.
J Cardiovasc Pharmacol, **26**:S37-9.
- 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**:II216-23.
- 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**:740-6.
- 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**:S244-7.

- 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**:329-36.
- Barton M, Cosentino F, Brandes RP, Moreau P, Shaw S, Luscher TF (1997a). Anatomic heterogeneity of vascular aging: role of nitric oxide and endothelin.
Hypertension, **30**:817-24.
- 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**:14367-72.
- Barton M, Shaw S, d'Uscio LV, Moreau P, Luscher TF (1997b). Angiotensin II increases vascular and renal endothelin-1 and functional endothelin converting enzyme activity in vivo: role of ETA receptors for endothelin regulation.
Biochem Biophys Res Commun, **238**:861-5.
- Barton M, Vos I, Shaw S, Boer P, D'Uscio LV, Grone HJ, Rabelink TJ, Lattmann T, Moreau P, Luscher TF (2000c). Dysfunctional renal nitric oxide synthase as a determinant of salt-sensitive hypertension: mechanisms of renal artery endothelial dysfunction and role of endothelin for vascular hypertrophy and glomerulosclerosis.
J Am Soc Nephrol, **11**:835-45.
- Battistini B, D'Orleans-Juste P, Sirois P (1993). Endothelins: circulating plasma levels and presence in other biologic fluids.
Lab Invest, **68**:600-28.
- Behr-Roussel D, Rupin A, Sansilvestri-Morel P, Fabiani JN, Verbeuren TJ (2000). Histochemical evidence for inducible nitric oxide synthase in advanced but non-ruptured human atherosclerotic carotid arteries.
Histochem J, **32**:41-51.
- Bohnemeier H, Pinto YM, Horkay F, Toth M, Juhasz-Nagy A, Orzechowski HD, Bohm M, Paul M (1998). Endothelin converting-enzyme-1 mRNA expression in human cardiovascular disease.
Clin Exp Hypertens, **20**:417-37.
- Bongrazio M, Baumann C, Zakrzewicz A, Pries AR, Gaehtgens P (2000). Evidence for modulation of genes involved in vascular adaptation by prolonged exposure of endothelial cells to shear stress.
Cardiovasc Res, **47**:384-93.
- Boulanger C, Luscher TF (1990). Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide.
J Clin Invest, **85**:587-90.
- Brambilla R, Bruckner K, Orioli D, Bergemann AD, Flanagan JG, Klein R (1996). Similarities and Differences in the Way Transmembrane-Type Ligands Interact with the Elk Subclass of Eph Receptors.
Mol Cell Neurosci, **8**:199-209.
- Britten MB, Zeiher AM, Schachinger V (1999). Clinical importance of coronary endothelial vasodilator dysfunction and therapeutic options.
J Intern Med, **245**:315-27.

- Camenisch G, Wenger RH, Gassmann M (2002). DNA-binding activity of hypoxia-inducible factors (HIFs). *Methods Mol Biol*, **196**:117-29.
- 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**:279-86.
- Challah M, Nadaud S, Philippe M, Battle T, Soubrier F, Corman B, Michel JB (1997). Circulating and cellular markers of endothelial dysfunction with aging in rats. *Am J Physiol*, **273**:H1941-8.
- Chen KD, Li YS, Kim M, Li S, Yuan S, Chien S, Shyy JY (1999). Mechanotransduction in response to shear stress. Roles of receptor tyrosine kinases, integrins, and Shc. *J Biol Chem*, **274**:18393-400.
- Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, **18**:5294-9.
- Corcoran GB, Salazar DE, Chan HH (1989). Obesity as a risk factor in drug-induced organ injury. III. Increased liver and kidney injury by furosemide in the obese overfed rat. *Toxicol Appl Pharmacol*, **98**:12-24.
- Davis ME, Cai H, Drummond GR, Harrison DG (2001). Shear stress regulates endothelial nitric oxide synthase expression through c-Src by divergent signaling pathways. *Circ Res*, **89**:1073-80.
- Davis S, Gale NW, Aldrich TH, Maisonpierre PC, Lhotak V, Pawson T, Goldfarb M, Yancopoulos GD (1994). Ligands for EPH-related receptor tyrosine kinases that require membrane attachment or clustering for activity. *Science*, **266**:816-9.
- de Nucci G, Thomas R, D'Orleans-Juste P, Antunes E, Walder C, Warner TD, Vane JR (1988). Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**:9797-800.
- Detmar M, Brown LF, Schon MP, Elicker BM, Velasco P, Richard L, Fukumura D, Monsky W, Claffey KP, Jain RK (1998). Increased microvascular density and enhanced leukocyte rolling and adhesion in the skin of VEGF transgenic mice. *J Invest Dermatol*, **111**:1-6.
- 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**:3430-5.
- Dimmeler S, Haendeler J, Rippmann V, Nehls M, Zeiher AM (1996). Shear stress inhibits apoptosis of human endothelial cells. *FEBS Lett*, **399**:71-4.
- Dumont DJ, Gradwohl G, Fong GH, Puri MC, Gertsenstein M, Auerbach A, Breitman ML (1994). Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *Genes Dev*, **8**:1897-909.

- Dzau VJ (1986). Significance of the vascular renin-angiotensin pathway. *Hypertension*, **8**:553-9.
- 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**:954-60.
- Emori T, Hirata Y, Ohta K, Shichiri M, Marumo F (1989). Secretory mechanism of immunoreactive endothelin in cultured bovine endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **160**:93-100.
- Emoto N, Nurhantari Y, Alimsardjono H, Xie J, Yamada T, Yanagisawa M, Matsuo M (1999). Constitutive lysosomal targeting and degradation of bovine endothelin-converting enzyme-1a mediated by novel signals in its alternatively spliced cytoplasmic tail. *J Biol Chem*, **274**:1509-18.
- Emoto N, Yanagisawa M (1995). Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J Biol Chem*, **270**:15262-8.
- Fiske WD, 3rd, Blouin RA, Mitchell B, McNamara PJ (1986). Renal function in the obese Zucker rat. *Int J Obes*, **10**:175-83.
- Fracarollo 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**:3963-73.
- Fujiyama S, Matsubara H, Nozawa Y, Maruyama K, Mori Y, Tsutsumi Y, Masaki H, Uchiyama Y, Koyama Y, Nose A, Iba O, Tateishi E, Ogata N, Jyo N, Higashiyama S, Iwasaka T (2001). Angiotensin AT(1) and AT(2) receptors differentially regulate angiopoietin-2 and vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis by modulating heparin binding-epidermal growth factor (EGF)-mediated EGF receptor transactivation. *Circ Res*, **88**:22-9.
- Fukuroda T, Fujikawa T, Ozaki S, Ishikawa K, Yano M, Nishikibe M (1994). Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, **199**:1461-5.
- 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**:614-27.
- 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**:1774-7.
- Gerety SS, Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ (1999). Symmetrical mutant phenotypes of the receptor EphB4 and its specific transmembrane ligand ephrin-B2 in cardiovascular development. *Mol Cell*, **4**:403-14.
- Gloe T, Riedmayr S, Sohn HY, Pohl U (1999). The 67-kDa laminin-binding protein is involved in shear stress-dependent endothelial nitric-oxide synthase expression. *J Biol Chem*, **274**:15996-6002.

- Goettsch S, Goettsch W, Morawietz H, Bayer P (2002). Shear stress mediates tyrosylprotein sulfotransferase isoform shift in human endothelial cells.
Biochem Biophys Res Commun, **294**:541-6.
- 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 inducible nitric oxide synthase isoform II in aging arteries in vivo: implications for atherosclerosis.
Biochem Biophys Res Commun, **280**:908-13.
- Gray G, Webb DJ. (1995) Molecular biology and pharmacology of the endothelins.
Austin, N.Y.: Springer, Inc.
- Gupte A, Frangos JA (1990). Effects of flow on the synthesis and release of fibronectin by endothelial cells.
In Vitro Cell Dev Biol, **26**:57-60.
- 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, **509**:599-606.
- 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**:649-59.
- Hasegawa H, Hiki K, Sawamura T, Aoyama T, Okamoto Y, Miwa S, Shimohama S, Kimura J, Masaki T (1998). Purification of a novel endothelin-converting enzyme specific for big endothelin-3.
FEBS Lett, **428**:304-8.
- Hashimoto M, Akishita M, Eto M, Kozaki K, Ako J, Sugimoto N, Yoshizumi M, Toba K, Ouchi Y (1998). The impairment of flow-mediated vasodilatation in obese men with visceral fat accumulation.
Int J Obes Relat Metab Disord, **22**:477-84.
- Haynes WG, Webb DJ (1998). Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease.
J Hypertens, **16**:1081-98.
- Heinroth-Hoffmann I, Vogelsang M, Schiewe P, Morawietz H, Holtz J, Ponicke K, Brodde OE (1998). Mechanism of ET(A)-receptor stimulation-induced increases in intracellular Ca²⁺ in SK-N-MC cells.
Br J Pharmacol, **125**:1202-11.
- Hieda HS, Gomez-Sanchez CE (1990). Hypoxia increases endothelin release in bovine endothelial cells in culture, but epinephrine, norepinephrine, serotonin, histamine and angiotensin II do not.
Life Sci, **47**:247-51.
- Hirata Y, Emori T, Eguchi S, Kanno K, Imai T, Ohta K, Marumo F (1993). Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells.
J Clin Invest, **91**:1367-73.
- Hoang MV, Turner AJ (1997). Novel activity of endothelin-converting enzyme: hydrolysis of bradykinin.
Biochem J, **327**:23-6.

- Hochoer B, Thone-Reineke C, Rohmeiss P, Schmager F, Slowinski T, Burst V, Siegmund F, Quertermous T, Bauer C, Neumayer HH, Schleuning WD, Theuring F (1997). Endothelin-1 transgenic mice develop glomerulosclerosis, interstitial fibrosis, and renal cysts but not hypertension.
J Clin Invest, **99**:1380-9.
- Hofer T, Wenger H, Gassmann M (2002). Oxygen sensing, HIF-1alpha stabilization and potential therapeutic strategies.
Pflugers Arch, **443**:503-7.
- Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, Yancopoulos GD, Wiegand SJ (1999). Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF.
Science, **284**:1994-8.
- Howard PG, Plumpton C, Davenport AP (1992). Anatomical localization and pharmacological activity of mature endothelins and their precursors in human vascular tissue.
J Hypertens, **10**:1379-86.
- Hsieh HJ, Li NQ, Frangos JA (1992). Shear-induced platelet-derived growth factor gene expression in human endothelial cells is mediated by protein kinase C.
J Cell Physiol, **150**:552-8.
- Hsieh HJ, Li NQ, Frangos JA (1993). Pulsatile and steady flow induces c-fos expression in human endothelial cells.
J Cell Physiol, **154**:143-51.
- Hu J, Discher DJ, Bishopric NH, Webster KA (1998). Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense strand.
Biochem Biophys Res Commun, **245**:894-9.
- Hu YL, Chien S (1997). Effects of shear stress on protein kinase C distribution in endothelial cells.
J Histochem Cytochem, **45**:237-49.
- Huang YQ, Li JJ, Karparkin S (2000). Identification of a family of alternatively spliced mRNA species of angiopoietin-1.
Blood, **95**:1993-9.
- Ikura T, Sawamura T, Shiraki T, Hosokawa H, Kido T, Hoshikawa H, Shimada K, Tanzawa K, Kobayashi S, Miwa S, et al. (1994). cDNA cloning and expression of bovine endothelin converting enzyme.
Biochem Biophys Res Commun, **203**:1417-22.
- 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**:753-7.
- Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T (1989a). The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes.
Proc Natl Acad Sci U S A, **86**:2863-7.
- Inoue A, Yanagisawa M, Takawa Y, Mitsui Y, Kobayashi M, Masaki T (1989b). The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression.
J Biol Chem, **264**:14954-9.

- Jackman HL, Morris PW, Rabito SF, Johansson GB, Skidgel RA, Erdos EG (1993). Inactivation of endothelin-1 by an enzyme of the vascular endothelial cells. *Hypertension*, **21**:925-8.
- 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**:2745-56.
- Jones N, Voskas D, Master Z, Sarao R, Jones J, Dumont DJ (2001). Rescue of the early vascular defects in Tek/Tie2 null mice reveals an essential survival function. *EMBO Rep*, **2**:438-45.
- Kaburagi S, Hasegawa K, Morimoto T, Araki M, Sawamura T, Masaki T, Sasayama S (1999). The role of endothelin-converting enzyme-1 in the development of alpha1- adrenergic-stimulated hypertrophy in cultured neonatal rat cardiac myocytes. *Circulation*, **99**:292-8.
- 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**:1429-37.
- Kai T, Shimada S, Sugimura K, Kurooka A, Takenaka T, Fukamizu A, Murakami K, Ishikawa K (1998). Tissue-localized angiotensin II enhances cardiac and renal disorders in Tsukuba hypertensive mice. *J Hypertens*, **16**:2045-9.
- Kannel WB (1997). Hazards, risks, and threats of heart disease from the early stages to symptomatic coronary heart disease and cardiac failure. *Cardiovasc Drugs Ther*, **11 Suppl 1**:199-212.
- 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**:1746-55.
- 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**:9114-9.
- Ko Y, Glodny B, Stier S, Totzke G, Nickenig G, Dusing R, Sachinidis A, Vetter H (1997). Angiotensin type-1 (AT1) receptor gene expression in primarily cultured human arterial umbilical endothelial cells. *Biochem Pharmacol*, **53**:417-21.
- Kohno M, Yasunari K, Murakawa K, Yokokawa K, Horio T, Fukui T, Takeda T (1990). Plasma immunoreactive endothelin in essential hypertension. *Am J Med*, **88**:614-8.
- Kohno M, Yasunari K, Yokokawa K, Murakawa K, Horio T, Takeda T (1991). Inhibition by atrial and brain natriuretic peptides of endothelin-1 secretion after stimulation with angiotensin II and thrombin of cultured human endothelial cells. *J Clin Invest*, **87**:1999-2004.
- Krauss RM, Winston M, Fletcher BJ, Grundy SM (1998). Obesity : impact on cardiovascular disease. *Circulation*, **98**:1472-6.

- La M, Reid JJ (1995). Endothelin-1 and the regulation of vascular tone. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **22**:315-23.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**:680-5.
- Larcher F, Murillas R, Bolontrade M, Conti CJ, Jorcano JL (1998). VEGF/VPF overexpression in skin of transgenic mice induces angiogenesis, vascular hyperpermeability and accelerated tumor development. *Oncogene*, **17**:303-11.
- 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**:1043-9.
- Ling S, Dai A, Ma YH, Wilson E, Chatterjee K, Ives HE, Sudhir K (1999). Matrix-dependent gene expression of egr-1 and PDGF A regulate angiotensin II-induced proliferation in human vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, **34**:1141-6.
- Loffler BM, Breu V, Clozel M (1993). Effect of different endothelin receptor antagonists and of the novel non-peptide antagonist Ro 46-2005 on endothelin levels in rat plasma. *FEBS Lett*, **333**:108-10.
- Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD (1997). Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*, **277**:55-60.
- Minkes RK, Coy DH, Murphy WA, McNamara DB, Kadowitz PJ (1989). Effects of porcine and rat endothelin and an analog on blood pressure in the anesthetized cat. *Eur J Pharmacol*, **164**:571-5.
- 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**:C572-8.
- Monge JC (1998). Neurohormonal markers of clinical outcome in cardiovascular disease: is endothelin the best one? *J Cardiovasc Pharmacol*, **32**:S36-42.
- Morawietz H, Goettsch W, Szibor M, Barton M, Shaw S, Hakim K, Zerkowski HR, Holtz J (2002). Increased expression of endothelin-converting enzyme-1 in failing human myocardium. *Clin Sci (Lond)*, **103 Suppl 1**:237S-40S.
- Morawietz H, Ma YH, Vives F, Wilson E, Sukhatme VP, Holtz J, Ives HE (1999). Rapid induction and translocation of Egr-1 in response to mechanical strain in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, **84**:678-87.
- 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**:III188-93.

- 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, **525 Pt 3**:761-70.
- Moreau P, d'Uscio LV, Shaw S, Takase H, Barton M, Luscher TF (1997). Angiotensin II increases tissue endothelin and induces vascular hypertrophy: reversal by ET(A)-receptor antagonist.
Circulation, **96**:1593-7.
- Moreau P, Takase H, Luscher TF (1996). Effect of endothelin antagonists on the responses to prostanoid endothelium-derived contracting factor.
Br J Pharmacol, **118**:1429-32.
- 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**:1097-105.
- Morita T, Yoshizumi M, Kurihara H, Maemura K, Nagai R, Yazaki Y (1993). Shear stress increases heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor mRNA levels in human vascular endothelial cells.
Biochem Biophys Res Commun, **197**:256-62.
- Mortensen LH, Fink GD (1990). Hemodynamic effect of human and rat endothelin administration into conscious rats.
Am J Physiol, **258**:H362-8.
- Muller JM, Chilian WM, Davis MJ (1997). Integrin signaling transduces shear stress--dependent vasodilation of coronary arterioles.
Circ Res, **80**:320-6.
- Mullis KB, Faloona FA (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.
Methods Enzymol, **155**:335-50.
- Nakamura S, Naruse M, Naruse K, Demura H, Uemura H (1990). Immunocytochemical localization of endothelin in cultured bovine endothelial cells.
Histochemistry, **94**:475-7.
- N'Diaye N, Pueyo ME, Battle T, Ossart C, Guedin D, Michel JB (1997). Conversion of big-endothelin-1 elicits an endothelin ETA receptor- mediated response in endothelial cells.
Eur J Pharmacol, **321**:387-96.
- Nelboeck P, Fuchs M, Bur D, Loffler BM (1998). Glycosylation of Asn-632 and Asn-651 is important for functional expression of endothelin-converting enzyme-1.
J Cardiovasc Pharmacol, **31**:S4-6.
- Nickenig G, Sachinidis A, Michaelsen F, Bohm M, Seewald S, Vetter H (1997). Upregulation of vascular angiotensin II receptor gene expression by low- density lipoprotein in vascular smooth muscle cells.
Circulation, **95**:473-8.
- Nishijo N, Takamine S, Sugiyama F, Kimoto K, Taniguchi K, Horiguchi H, Ogata T, Murakami K, Fukamizu A, Yagami K (1999). Vascular remodeling in hypertensive transgenic mice.
Exp Anim, **48**:203-8.
- Oh H, Takagi H, Suzuma K, Otani A, Matsumura M, Honda Y (1999). Hypoxia and vascular endothelial growth factor selectively up-regulate angiopoietin-2 in bovine microvascular endothelial cells.
J Biol Chem, **274**:15732-9.

- Okada K, Arai Y, Hata M, Matsuyama K, Yano M (1993). Big endothelin-1 structure important for specific processing by endothelin-converting enzyme of bovine endothelial cells.
Eur J Biochem, **218**:493-8.
- Okada K, Takada J, Arai Y, Matsuyama K, Yano M (1991). Importance of the C-terminal region of big endothelin-1 for specific conversion by phosphoramidon-sensitive endothelin converting enzyme.
Biochem Biophys Res Commun, **180**:1019-23.
- 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**:512-21.
- Otani A, Takagi H, Oh H, Koyama S, Honda Y (2001). Angiotensin II induces expression of the Tie2 receptor ligand, angiopoietin-2, in bovine retinal endothelial cells.
Diabetes, **50**:867-75.
- Palmer A, Zimmer M, Erdmann KS, Eulenburg V, Porthin A, Heumann R, Deutsch U, Klein R (2002). EphrinB phosphorylation and reverse signaling: regulation by Src kinases and PTP-BL phosphatase.
Mol Cell, **9**:725-37.
- Parrinello G, Scaglione R, Pinto A, Corrao S, Cecala M, Di Silvestre G, Amato P, Licata A, Licata G (1996). Central obesity and hypertension: the role of plasma endothelin.
Am J Hypertens, **9**:1186-91.
- 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**:1802-9.
- Plumpton C, Champeney R, Ashby MJ, Kuc RE, Davenport AP (1993). Characterization of endothelin isoforms in human heart: endothelin-2 demonstrated.
J Cardiovasc Pharmacol, **22**:S26-8.
- Ponicke K, Vogelsang M, Heinroth M, Becker K, Zolk O, Bohm M, Zerkowski HR, Brodde OE (1998). Endothelin receptors in the failing and nonfailing human heart.
Circulation, **97**:744-51.
- Predel HG, Yang Z, von Segesser L, Turina M, Buhler FR, Luscher TF (1992). Implications of pulsatile stretch on growth of saphenous vein and mammary artery smooth muscle.
Lancet, **340**:878-9.
- Procopio WN, Pelavin PI, Lee WM, Yeilding NM (1999). Angiopoietin-1 and -2 coiled coil domains mediate distinct homo- oligomerization patterns, but fibrinogen-like domains mediate ligand activity.
J Biol Chem, **274**:30196-201.
- Quaschnig T, Ruschitzka F, Stallmach T, Shaw S, Morawietz H, Goettsch W, Slowinski T, Theuring F, Hoher B, Lüscher TF, Gassmann M (2002). Erythropoietin-induced excessive erythrocytosis activates the tissue endothelin system in mice.
Faseb J, **in press**.
- Radomski MW, Palmer RM, Moncada S (1987). Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets.
Br J Pharmacol, **92**:181-7.

- Reckelhoff JF, Kanji V, Racusen LC, Schmidt AM, Yan SD, Marrow J, Roberts LJ, 2nd, Salahudeen AK (1998). Vitamin E ameliorates enhanced renal lipid peroxidation and accumulation of F2-isoprostanes in aging kidneys.
Am J Physiol, **274**:R767-74.
- 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**:1046-53.
- Riches FM, Watts GF, Hua J, Stewart GR, Naoumova RP, Barrett PH (1999). Reduction in visceral adipose tissue is associated with improvement in apolipoprotein B-100 metabolism in obese men.
J Clin Endocrinol Metab, **84**:2854-61.
- Rubanyi GM, Botelho LH (1991). Endothelins.
Faseb J, **5**:2713-20.
- 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**:49-56.
- Ruschitzka FT, Wenger RH, Stallmach T, Quaschnig T, de Wit C, Wagner K, Labugger R, Kelm M, Noll G, Rulicke T, Shaw S, Lindberg RL, Rodenwaldt B, Lutz H, Bauer C, Luscher TF, Gassmann M (2000). Nitric oxide prevents cardiovascular disease and determines survival in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin.
Proc Natl Acad Sci U S A, **97**:11609-13.
- Saito Y, Nakao K, Mukoyama M, Imura H (1990). Increased plasma endothelin level in patients with essential hypertension [letter].
N Engl J Med, **322**:205.
- Sakai S, Miyauchi T, Kobayashi M, Yamaguchi I, Goto K, Sugishita Y (1996). Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure.
Nature, **384**:353-5.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) Molecular cloning : a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc Natl Acad Sci U S A, **74**:5463-7.
- Sato TN, Qin Y, Kozak CA, Audus KL (1993). Tie-1 and tie-2 define another class of putative receptor tyrosine kinase genes expressed in early embryonic vascular system.
Proc Natl Acad Sci U S A, **90**:9355-8.
- Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, Gridley T, Wolburg H, Risau W, Qin Y (1995). Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation.
Nature, **376**:70-4.
- Scandinavian, Simvastatin, Survival, Study, Group (1994). Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S).
Lancet, **344**:1383-9.
- Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM (2000). Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long- term outcome of coronary heart disease.
Circulation, **101**:1899-906.

- 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**:238-43.
- Schweizer A, Valdenaire O, Nelbock P, Deuschle U, Dumas Milne Edwards JB, Stumpf JG, Loffler BM (1997). Human endothelin-converting enzyme (ECE-1): three isoforms with distinct subcellular localizations.
Biochem J, **328**:871-7.
- Sdougos HP, Bussolari SR, Dewey CF (1984). Secondary flow and turbulence in a cone-and-plate device.
J Fluid Mech, **138**:379-404.
- Shimada K, Matsushita Y, Wakabayashi K, Takahashi M, Matsubara A, Iijima Y, Tanzawa K (1995a). Cloning and functional expression of human endothelin-converting enzyme cDNA.
Biochem Biophys Res Commun, **207**:807-12.
- Shimada K, Takahashi M, Ikeda M, Tanzawa K (1995b). Identification and characterization of two isoforms of an endothelin- converting enzyme-1.
FEBS Lett, **371**:140-4.
- Shimada K, Takahashi M, Tanzawa K (1994). Cloning and functional expression of endothelin-converting enzyme from rat endothelial cells.
J Biol Chem, **269**:18275-8.
- Sirvio ML, Metsarinne K, Saijonmaa O, Fyhrquist F (1990). Tissue distribution and half-life of ¹²⁵I-endothelin in the rat: importance of pulmonary clearance.
Biochem Biophys Res Commun, **167**:1191-5.
- Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, Johnson A, Brechtel G, Baron AD (1996). Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance.
J Clin Invest, **97**:2601-10.
- Stratmann A, Risau W, Plate KH (1998). Cell type-specific expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 suggests a role in glioblastoma angiogenesis.
Am J Pathol, **153**:1459-66.
- Sugden PH, Bogoyevitch MA (1996). Endothelin-1-Dependent Signaling Pathways in the Myocardium.
Trends in Cardiovascular Medicine, **6**:87-94.
- Sugden PH, Fuller SJ, Mynett JR, Hatchett RJ, Bogoyevitch MA, Sugden MC (1993). Stimulation of adult rat ventricular myocyte protein synthesis and phosphoinositide hydrolysis by the endothelins.
Biochim Biophys Acta, **1175**:327-32.
- Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD (1996). Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis.
Cell, **87**:1171-80.
- 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**:149-51.
- Takahashi M, Berk BC (1996). Mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) activation by shear stress and adhesion in endothelial cells. Essential role for a herbimycin- sensitive kinase.
J Clin Invest, **98**:2623-31.

- Takai S, Jin D, Hara K, Takami H, Fujita T, Miyazaki M (1998). 12-Hydroxyeicosatetraenoic acid directly potentiates angiotensin II- induced vascular contraction.
Eur J Pharmacol, **358**:161-4.
- Takai S, Jin D, Kirimura K, Ikeda J, Sakaguchi M, Baba K, Fujita T, Miyazaki M (1999). Effects of a lipoxygenase inhibitor, panaxynol, on vascular contraction induced by angiotensin II.
Jpn J Pharmacol, **80**:89-92.
- Thoumine O, Nerem RM, Girard PR (1995). Changes in organization and composition of the extracellular matrix underlying cultured endothelial cells exposed to laminar steady shear stress.
Lab Invest, **73**:565-76.
- Thurston G, Suri C, Smith K, McClain J, Sato TN, Yancopoulos GD, McDonald DM (1999). Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1.
Science, **286**:2511-4.
- Tiret L, Poirier O, Hallet V, McDonagh TA, Morrison C, McMurray JJ, Dargie HJ, Arveiler D, Ruidavets JB, Luc G, Evans A, Cambien F (1999). The Lys198Asn polymorphism in the endothelin-1 gene is associated with blood pressure in overweight people.
Hypertension, **33**:1169-74.
- Tschudi MR, Barton M, Bersinger NA, Moreau P, Cosentino F, Noll G, Malinski T, Luscher TF (1996). Effect of age on kinetics of nitric oxide release in rat aorta and pulmonary artery.
J Clin Invest, **98**:899-905.
- Upchurch GR, Jr., Banes AJ, Wagner WH, Ramadan F, Link GW, Henderson RH, Johnson G, Jr. (1989). Differences in secretion of prostacyclin by venous and arterial endothelial cells grown in vitro in a static versus a mechanically active environment.
J Vasc Surg, **10**:292-8.
- Valdenaire O, Lepailleur-Enouf D, Egidy G, Thouard A, Barret A, Vranckx R, Tougaard C, Michel JB (1999). A fourth isoform of endothelin-converting enzyme (ECE-1) is generated from an additional promoter molecular cloning and characterization.
Eur J Biochem, **264**:341-9.
- Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P, Pritchard KA, Jr. (1998). Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors.
Proc Natl Acad Sci U S A, **95**:9220-5.
- Verbeuren TJ, Bonhomme E, Laubie M, Simonet S (1993). Evidence for induction of nonendothelial NO synthase in aortas of cholesterol-fed rabbits.
J Cardiovasc Pharmacol, **21**:841-5.
- Wagner OF, Christ G, Wojta J, Vierhapper H, Parzer S, Nowotny PJ, Schneider B, Waldhausl W, Binder BR (1992a). Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells.
J Biol Chem, **267**:16066-8.
- Wagner OF, Vierhapper H, Gasic S, Nowotny P, Waldhausl W (1992b). Regional effects and clearance of endothelin-1 across pulmonary and splanchnic circulation.
Eur J Clin Invest, **22**:277-82.
- Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ (1998). Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4.
Cell, **93**:741-53.

- Wang W, Wang S, Yan L, Madara P, Del Pilar Cintron A, Wesley RA, Danner RL (2000). Superoxide production and reactive oxygen species signaling by endothelial nitric-oxide synthase.
J Biol Chem, **275**:16899-903.
- Weidmann P, de Courten M, Boehlen L, Shaw S (1993). The pathogenesis of hypertension in obese subjects.
Drugs, **46**:197-208; discussion 208-9.
- Wever RM, van Dam T, van Rijn HJ, de Groot F, Rabelink TJ (1997). Tetrahydrobiopterin regulates superoxide and nitric oxide generation by recombinant endothelial nitric oxide synthase.
Biochem Biophys Res Commun, **237**:340-4.
- WHO (1993). Cardiovascular Disease Mortality in the Developing Countries.
World Health Statistics Quarterly, **46**:121.
- Wilkinson DG (2001). Multiple roles of EPH receptors and ephrins in neural development.
Nat Rev Neurosci, **2**:155-64.
- Wilmink HW, Banga JD, Hijmering M, Erkelens WD, Stroes ES, Rabelink TJ (1999). Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor antagonism on postprandial endothelial function.
J Am Coll Cardiol, **34**:140-5.
- 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**:741-7.
- Wong AL, Haroon ZA, Werner S, Dewhirst MW, Greenberg CS, Peters KG (1997). Tie2 expression and phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues.
Circ Res, **81**:567-74.
- 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**:473-85.
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Goto K, Masaki T (1988). A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca²⁺ channels.
J Hypertens Suppl, **6**:S188-91.
- Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation.
Nature, **407**:242-8.
- Yoshida H, Nakamura M (1992). Inhibition by angiotensin converting enzyme inhibitors of endothelin secretion from cultured human endothelial cells.
Life Sci, **50**:L195-200.
- Yuan HT, Yang SP, Woolf AS (2000). Hypoxia up-regulates angiopoietin-2, a Tie-2 ligand, in mouse mesangial cells.
Kidney Int, **58**:1912-9.
- Yusuf S (1998). The global problem of cardiovascular disease.
Int J Clin Pract Suppl, **94**:3-6.

Zagzag D, Hooper A, Friedlander DR, Chan W, Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD, Grumet M (1999). In situ expression of angiopoietins in astrocytomas identifies angiopoietin-2 as an early marker of tumor angiogenesis.

Exp Neurol, **159**:391-400.

Zaugg CE, Hornstein PS, Zhu P, Simper D, Luscher TF, Allegrini PR, Buser PT (1996). Endothelin-1-induced release of thromboxane A2 increases the vasoconstrictor effect of endothelin-1 in postischemic reperfused rat hearts.

Circulation, **94**:742-7.

Zeihler 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**:652-62.

Zhou R (1998). The Eph family receptors and ligands.

Pharmacol Ther, **77**:151-81.

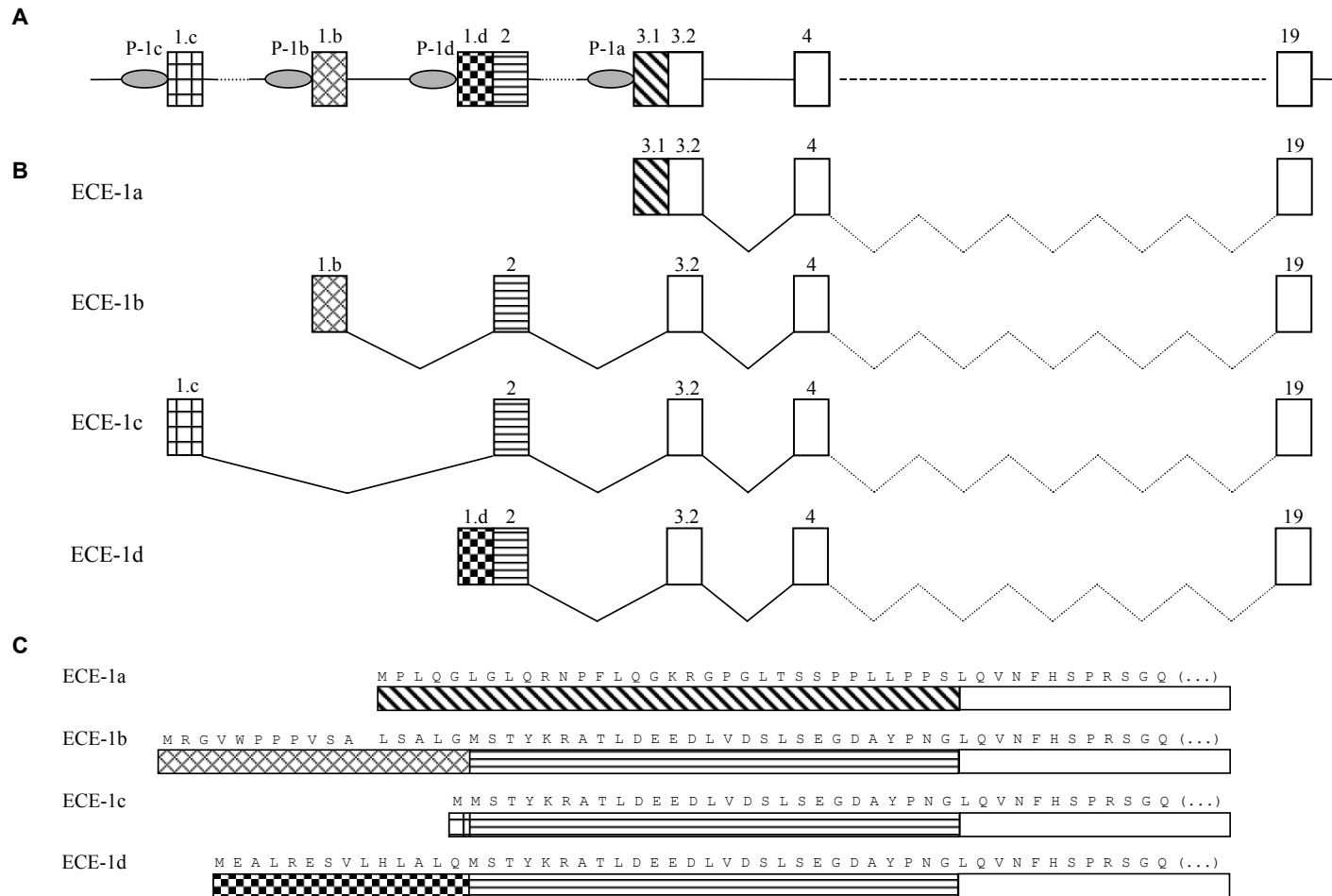
Ziegler SF, Bird TA, Schneringer JA, Schooley KA, Baum PR (1993). Molecular cloning and characterization of a novel receptor protein tyrosine kinase from human placenta.

Oncogene, **8**:663-70.

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**:2118-23.

ECE-1 Genstruktur



Genstruktur von ECE-1 auf dem Chromosomenabschnitt 1p36.1. (A) Chromosomenabschnitt mit eingezeichneten Exonen 0 – 19, die Exonen 5 – 18 sind nicht dargestellt. Die ECE-1-Isoformen haben distinkte Promotoren vor dem jeweiligen ersten Exon (P). Das Exon 3.2 enthält die Transmembrandomäne, Exon 16 das zinkbindende HEXXH-Motiv. (B) Exonen der ECE-1-Isoformen. Alle Exonen in 3'-Richtung. (C) N-terminale Aminosäuresequenzen der ECE-1-Isoformen.

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die mir bei den Arbeiten und der Erstellung meiner Dissertation geholfen und beigestanden haben.

Zuerst gilt mein Dank dem Leiter des Instituts für Pathophysiologie Prof. Dr. J. Holtz für die Möglichkeit, in seinem Institut diese Dissertation zu erstellen, sowie für die wohlwollende Unterstützung bei allen auftretenden Problemen.

Herrn PD Dr. H. Morawietz, dem Leiter der Arbeitsgruppe Endothelzellbiologie, möchte ich für die intensive Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit danken. Seine Fähigkeit, sich immer wieder vorbehaltlos mit meinen kritischen Fragen auseinanderzusetzen, hat mich sehr beeindruckt. Die von ihm vom ersten Tag an ermöglichten und geforderten Präsentationen der Ergebnisse des wissenschaftlichen Fortgangs der Arbeit auf Tagungen und Kongressen im In- und Ausland haben wesentlich zu meiner wissenschaftlichen Entwicklung beigetragen. Dafür bin ich Ihm sehr dankbar!

Mein besonderer Dank gilt unserem Kooperationspartner PD Dr. med. Matthias Barton (Kantonsspital Zürich). Ohne ihn wären die Untersuchungen in Tiermodellen nicht möglich gewesen!

Ein ganz herzlicher Dank gilt Dr. Thomas Quaschnig für die gemeinsamen Arbeiten zur „EPO Maus“.

Weiterhin möchte ich Stefanie Müller-Kämpf (Hochschule Aachen), Dr. Andreas Wagner (Universität Göttingen), Dr. Andreas Schubert (Herzzentrum Leipzig), PD Dr. H. G. Augustin und seinen Mitarbeitern Tim Füller und Gudrun Dandekar (Tumorbiologiezentrum Freiburg) sowie Dr. Sidney Shaw (Universität Bern) für die Möglichkeit und Unterstützung bei der Erlernung und Etablierung neuer Methoden in ihren jeweiligen Laboren danken.

Dr. Günther Richter und PD Dr. Andreas Simm, die mir im Zamed bei den FACS-Versuchen sehr geholfen haben, möchte ich hiermit recht herzlich danken.

Babett Bartling, Dorothea Darmer, Nicole Dürrschmidt, Susanne Rohrbach, Uwe Rückschloss, Susanne Stein, Marten Szibor und Heike & Mike Tostlebe als Kollegen/innen des Instituts für Pathophysiologie möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die tatkräftige Unterstützung und die lebhaften Diskussionen danken.

Roland Busath, Frau Gall und Frau Heinze möchte ich für ihre technischen Unterstützungen danken. Gerade die Routine von Frau Gall in der Zellkultur hat sehr zum Fortgang der Arbeiten beigetragen. Ohne Rolands geschultes Auge hätten die Poster und Vorträge sicher erheblich an Übersichtlichkeit und Klarheit eingebüßt.

Nicht vergessen möchte ich meine Familie und Freunde, die während der gesamten Zeit der Erstellung der Arbeit immer Verständnis aufgebracht haben.

Diese Danksagung wäre unvollständig ohne den Dank an meine Frau. Ihre Bereitschaft die lange Zeit der Trennung nicht nur durchzustehen, sondern auch die gemeinsamen Wochenenden schon am Frühstückstisch mit wissenschaftlichen Diskussionen und den Rest der Tage im Labor zu verbringen, haben die Fertigstellung dieser Arbeit überhaupt erst ermöglicht. Danke!

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, die vorliegende Dissertationsschrift selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt zu haben. Die wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen aus veröffentlichten Schriften sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher an keiner weiteren Hochschule oder Universität zur Promotion eingereicht.

Winfried Göttisch

Halle (Saale), 27.November 2002

Lebenslauf

Name: Winfried Göttisch
Geburtstag: 19. Dezember 1968
Geburtsort: Hildesheim

1976 - 1979	Grundschule Itzum	Hildesheim (Niedersachsen)
1979 - 1985	Gymnasium Himmelsthür Erweiterter Sekundarabschluß I (17.07.1985)	Hildesheim (Niedersachsen)
1985 - 1988	Ausbildung im Bundesgrenzschutz Polizeihauptwachtmeister im BGS (01.04.1988)	Bodenteich (Niedersachsen) Goslar (Niedersachsen) Hannover (Niedersachsen)
1988 - 1992	Tätigkeit im Bundesgrenzschutz Polizeimeister im BGS (01.05.1990) Entlassung auf eigenen Antrag (30.09.1992)	Goslar (Niedersachsen)
1991 - 1994	Abendoberschule VHS-Hildesheim Allgemeine Hochschulreife (18.05.1994)	Hildesheim (Niedersachsen)
1994 - 1999	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg 26.08 – 04.10.96 Praktikum AgrEvo GmbH 21.07 – 26.09.97 Praktikum Boehringer Ingelheim KG Diplom-Biochemiker (16.07.1999)	Halle (Sachsen-Anhalt) Frankfurt (Hessen) Ingelheim (Rheinland-Pfalz)
seit 1999	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pathophysiologie der Medizinischen Fakultät	Halle (Sachsen-Anhalt)

Winfried Göttisch

Halle (Saale), November 2002

Publikationen und Kongressbeiträge

Publikationen

Barton M, Carmona R, Morawietz H, d'Uscio LV, **Goettsch W**, Hillen H, Haudenschild CC, Krieger JE, Münter K, Lattmann T, Lüscher TF, Shaw S (2000). 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

Duerrschmidt N, Wippich N, **Goettsch W**, Broemme H-J, Morawietz H (2000). Endothelin-1 induces NAD(P)H oxidase in human endothelial cells
Biochem. Biophys. Res. Commun., **269**:713-717

Barton M, Carmona R, Krieger JE, **Goettsch W**, Morawietz H, d'Uscio LV, Lattmann T, Lüscher TF, Shaw S (2000). Endothelin regulates angiotensin-converting enzyme in the mouse kidney
J. Cardiovasc. Pharmacol., **36**:S244-S247

Morawietz H, Szibor M, **Goettsch W**, Bartling B, Barton M, Shaw S, Koerfer R, Zerkowski H-R, Holtz J (2000). 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-III193

Goettsch W, Lattmann T, Amann K, Szibor M, Morawietz H, Münter K, Müller 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

Goettsch S, **Goettsch W**, Morawietz H, Bayer P (2002). Shear stress mediates tyrosylprotein sulfotransferase isoform shift in human endothelial cells
Biochem. Biophys. Res. Commun., **294**:541-546

Morawietz H, **Goettsch W**, Szibor M, Barton M, Shaw S, Hakim K, Zerkowski H-R, Holtz J (2002). Increased expression of endothelin-converting enzyme-1 in failing human myocardium
Clin. Sci. (Lond.), **103**:237S-240S

Morawietz H, **Goettsch W**, Szibor M, Barton M, Shaw S, Hakim K, Zerkowski H-R, Holtz J (2002). Angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy prevents upregulation of endothelin-converting enzyme-1 in failing human myocardium
Biochem. Biophys. Res. Commun., **295**:1057-1061

Traupe T, Lang M, **Goettsch W**, Münter K, Morawietz H, Vetter W, Barton M (2002). Obesity increases prostanoid-mediated vasoconstriction and vascular thromboxane receptor receptor gene expression
J Hypertens, **20**:2239-2245

Quaschnig T, Ruschitzka F, Stallmach T, Shaw S, Morawietz H, **Goettsch W**, Slowinski T, Theuring F, Hoher B, Lüscher TF and Gassmann M (2002). Erythropoietin-induced excessive erythrocytosis activates the tissue endothelin system in mice
The FASEB Journal, (in press)

Kongressbeiträge:

Morawietz H, Rückschloß U, **Götsch W**, Szibor M, Darmer D, Hakim K, Zerkowski H-R, Holtz J (1999)

Up-regulation of endothelin-converting enzyme and endothelin receptor A in myocardium of patients with end-stage heart failure

Pflügers Arch (Eur J Physiol), **437**:R59

Morawietz H, Wagner A, **Götsch W**, Bartling B, Holtz J, Hecker M (1999)

Shear stress-dependent induction of immediate-early genes is mediated by endothelin receptor B in human endothelial cells

Pflügers Arch (Eur J Physiol), **437**:R162

Morawietz H, Wagner A, **Götsch W**, Bartling B, Holtz J, Hecker M (1999)

Induktion von „immediate early genes“ durch Schubspannung in humanen Endothelzellen erfolgt über Endothelin B-Rezeptoren

Z Kardiol, **88** (Suppl. 1):281

Morawietz H, Talanow R, **Goettsch W**, Szibor M, Rueckschloss U, Schubert A, Bartling B, Holtz J (1999)

Regulation of the endothelin system by shear stress in human endothelial cells

Basic Res Cardiol **94**:377

Duerrschmidt N, **Goettsch W**, Morawietz H (2000)

Endothelin induces NAD(P)H oxidase subunit gp91^{phox} in human endothelial cells

Pflügers Arch (Eur J Physiol), **439**:R303

Morawietz H, Szibor M, **Goettsch W**, Bartling B, Barton M, Shaw S, Koerfer R, Zerkowski H-R, Holtz J (2000)

Deloading of the left ventricle by ventricular assist device normalizes increased expression of endothelin ET_A receptors in patients with end-stage heart failure

Pflügers Arch (Eur J Physiol), **439**:R367

Götsch W, Dürrschmidt N, Morawietz H (2000)

Angiotensin-vermittelte Regulation von Endothelin-converting enzyme-1-Isoformen in humanen Endothelzellen

Z Kardiol, **89** (Suppl. 5):143

Goettsch W, Duerrschmitt N, Morawietz H (2000)

Angiotensin-mediated regulation of endothelin-converting enzyme-1 isoforms in human endothelial cells

Circulation, **102** (Suppl.):II-171

Morawietz H, **Goettsch W**, Szibor M, Barton M, Shaw S, Hakim K, Zerkowski H-R, Holtz J (2001)

Upregulation of endothelin-converting enzyme-1 and endothelin-1 in atrial myocardium of patients with end-stage heart failure

Eur Heart J, **22** (Suppl.):39

Morawietz H, Wagner A, **Goettsch W**, Bartling B, Hecker M (2001)

Induction of Egr-1 and c-jun by laminar shear stress in human endothelial cells is mediated by endothelin receptor B

Eur Heart J, **22** (Suppl.):482

Morawietz H, **Goettsch W**, Szibor M, Barton M, Shaw S, Hakim K, Zerkowski H-R, Holtz J (2001)

Increased expression of endothelin-converting enzyme-1 in failing human myocardium
Seventh International Conference on Endothelin, Edinburgh, UK, Book of Abstracts: P119

Goettsch W, Augustin HG, Morawietz H (2001)

Shear stress regulates essential mediators of vascular development and differentiation ephrin-B2/EphB4 and angiotensin-2/Tie-2 in human endothelial cells
Basic Res Cardiol **96** (Suppl. 1):I/18

Duerrschmidt N, **Goettsch W**, Morawietz H (2001)

Regulation of NAD(P)H oxidase by arterial shear stress in human endothelial cells
Circulation, **104** (Suppl.):II-295

Duerrschmidt N, **Goettsch W**, Morawietz H (2002)

Regulation of NAD(P)H oxidase subunit expression by arterial shear stress in human endothelial cells
Pflügers Arch (Eur J Physiol), **443**:S 198

Goettsch W, Augustin HG, Morawietz H (2002)

Regulation des ephrin/Eph- und angiotensin/Tie-Systeme durch Schubspannung in humanen Endothelzellen
Z Kardiol, **91** (Suppl. 1):I/329

Goettsch S, **Goettsch W**, Morawietz H, Bayer P (2002)

Influence of shear stress on the expression of tyrosylprotein sulfotransferases in human endothelial cells
Eur J Biochem, **269** (Suppl. 1):72

Goettsch W, Augustin HG, Morawietz H (2002)

Regulation of mediators of vascular development and remodeling ephrin-B2 and angiotensin-2 by shear stress in human venous and arterial endothelial cells
Circulation, **106** (Suppl.):II-216

Goettsch S, **Goettsch W**, Morawietz H, Bayer P

Induction of tyrosylprotein sulfotransferase isoform shift in human endothelial cells
Circulation, **106** (Suppl.):II-287

Morawietz H, **Goettsch W**, Szibor M, Barton M, Shaw S, Hakim K, Zerkowski H-R, Holtz J (2002)

Increased endothelin-converting enzyme-1 expression and endothelin-1 peptide levels in myocardium of patients with end-stage heart failure
Circulation, **106** (Suppl.):II-684